

EENIGE PROEVEN OVER DEN INVLOED VAN DEN REËLEN ZUURHEIDSGRAAD OP DE RIJPING VAN EDAMMER KAAS

DOOR

H. A. SIRKS

(Ingezonden 16 Juni 1943)

INLEIDING

Reeds lang is bekend, dat de reële zuurheidsgraad der kaas een der belangrijkste factoren is, die de consistentie van het zuivel beïnvloeden. Zoo neemt men aan, dat bij een hoogen zuurheidsgraad der zeer jonge Edammer kaas, wanneer de pH bijv. eenige tiende eenheden lager dan 5,0 blijkt te zijn, in den regel bij de rijping geen plastisch en uitsmeerbaar zuivel, doch een „brosse” of „korte” kaas kan verwacht worden en ook, dat bij een aanvankelijken pH hooger dan 5,4 de kans op afwijkend zuivel, wat den smaak betreft, aanzienlijk verhoogd is.

Over den invloed echter, die in de verschillende rijpingsstadia door den pH op de hoeveelheden der diverse groepen eiwitplitsingsproducten wordt uitgeoefend en, in verband daarmee, op de consistentie der kaas en de smaakontwikkeling daarin, is nog maar zeer weinig bekend.

Wel eenigszins in die richting ging het onderzoek, in 1929 met Emmen-thaler kaas verricht door WATSON (1), die tevens in een literatuuroverzicht mededeelt, wat reeds over den invloed van den potentiëlen en den reëlen zuurheidsgraad der kaas op de consistentie daarvan bekend was. Hij bereidde eenige malen, telkens uit dezelfde melk, 2 kazen van 50 à 60 Amerikaansche ponden en wel op dezelfde wijze, behalve dat aan elk der 2 bakken kaasmelk een zuursel met aanmerkelijk uiteenlopend zuurproduceerend vermogen in gelijke hoeveelheden werd toegevoegd. Hierdoor bereikte hij, dat in de 2 kazen, één dag na hun bereiding, een vrij belangrijk pH-verschil werd gevonden. In de na $3\frac{1}{2}$ à 5 maanden gerijpte kazen, werd o.a. de pH, de totale en de wateroplosbare stikstof (W.N.), de aminozuurstikstof, als ook de stevigheid der kazen nagegaan.

Het resultaat dezer proeven komt in het kort hierop neer, dat de pH-verschillen, die één dag na de bereiding meestal 0,3 à 0,4 bedroegen, na de rijping veel geringer geworden waren niet alleen, maar nu dikwijls in tegengestelden zin als vroeger waren gelegen. Verder bleek, dat de *aanvankelijk* zuurdere kaas na de rijping soms meer, soms minder W.N. bevatte dan de andere, oorspronkelijk minder zure kaas van dezelfde parallelproef. Een bepaald verband tusschen de *na het rijpen* gemeten pH's en de cijfers der W.N. was evenmin te constateeren. Het aminozuur-N-gehalte echter, bepaald volgens VAN SLIJKE, was na de rijping bij de *oorspronkelijk* zuurdere kazen steeds niet onbelangrijk hooger dan bij de

aanvankelijk minder zure kazen. De stevigheid van het zuivel, penetrometrisch bepaald, bleek na de rijping bij alle oorspronkelijk zuurdere kazen het grootst te zijn; de bouw van het zuivel werd over het algemeen van de andere kazen het best geacht. Tenslotte wijst Watson er nog op, dat hoewel het bekend is, dat bij het in oplosbaren vorm overgaan der kaas-eiwitten een Cheddar kaas zachter wordt, uit zijn proeven met Emmenthaler kaas volgt, dat de gewenschte zachtheid van het zuivel niet behoeft samen te gaan met een hoogen graad van eiwitsplitsing.

Als een ander onderzoek in deze richting kan nog genoemd worden dat van SHERWOOD en WHITEHEAD (2) over den invloed van verschillende stammen melkzuurstreptococcen op de rijping van Cheddar kaas, waaraan het volgende is ontleend. Bij één der parallelproeven met dezelfde gepasteuriseerde melk werd o.a. aan één bak kaasmelk een reïncultuur van krachtig zuurvormende melkzuurstreptococcen toegevoegd; aan een tweede bak veel minder sterke zuurvormers. De *extracten* der hiermee bereide kazen hadden aanvankelijk sterk uiteenlopende pH's, resp. 5,4 en 5,8, die na 3 weken tot 5,1 en 5,3 daalden, waarna het verschil in de 2 volgende maanden nog iets kleiner werd. Hiermee ging een sterkere proteolyse gepaard in de zuurdere kaas dan in de minder zure, zich uitende o.a. in een grootere hoeveelheid oplosbare N en „niet-proteïne-N". Het verschil in kwaliteit der kazen was gering.

Aangezien er, behalve deze waarnemingen, geen belangrijke gegevens over den pH-invloed op de chemische en physische eigenschappen in verschillende rijpingsstadia van harde kaassoorten bekend zijn, werd een nader systematisch onderzoek hierover gewenscht geacht, daar meerdere kennis aangaande dit probleem aan een doelmatige wijze van kaاسبereiding ten goede zal kunnen komen, te meer, daar de pH-bepaling in kaas door vereenvoudiging der methode en apparatuur meer en meer voor de praktijk toegankelijk is geworden (3, 4, 5).

Alvorens met de eigenlijke proeven te beginnen, scheen het, met het oog op het chemisch onderzoek der te bereiden proefkazen, gewenscht de daarvoor gebruikelijke methoden, na raadpleging der betreffende literatuur, op hun geschiktheid voor het hier beoogde doel te onderzoeken en zoo noodig te wijzigen of door andere te vervangen.

HOOFDSTUK I

Onderzoek over de te bezigen analysemethoden

1. *Bereiding der kaasextracten*

Wanneer men wil weten, in welke mate de rijping van een bepaalde kaas zich in chemisch opzicht ontwikkelt, is het o.a. gewenscht om te onderzoeken, in hoeverre het stikstofgehalte der totale hoeveelheid oplosbare stoffen der kaas, kortweg „wateroplosbare N" (W.N.) genoemd en uitgedrukt in % der totale kaasstikstof (T.N.), na verschillende rijpingstijden toeneemt. Gewoonlijk tracht men dit te bereiken door telkens een afgewogen hoeveelheid der fijngemaakte kaas met een bepaalde hoeveelheid water te extraheeren en in het gefiltreerde extract de stikstof te bepalen.

Om het bezwaar te ontgaan, dat tegen deze methode kan worden gecopperd, n.m. het bij het extraheeren met veel water waarschijnlijk intreden van veranderingen in den oplosbaarheidstoestand der in de kaas aanwezige eiwitsplitsingsproducten, werd door BARTHEL c.s. (6) in 1928 een andere methode voorgesteld. Deze methode, die op het onder sterken druk uitspersen der kaasmassa berust, heeft echter weinig navolging gevonden, daar een voor de analyses voldoende hoeveelheid perssap, vrij van vet en andere in water onoplosbare bestanddeelen, vooral bij de harde kaassoorten, zeer moeilijk is te verkrijgen. Ook is het volgens ORLA JENSEN (7) waarschijnlijk, dat de gerijpte kaas te weinig vocht bevat, om al de aanwezige „wateroplosbare” eiwitsplitsingsproducten — waar het tenslotte om gaat — in oplossing te houden, zoodat bijv. uitgekristalliseerde aminozuren, gedeeltelijk wellicht als zouten, in de kaas kunnen voorkomen, die niet in het perssap, doch wel in een waterig extract zullen overgaan. Voor het gestelde doel verdient de extractiemethode dus de voorkeur.

Wel zal men er op bedacht moeten zijn, de extracties steeds onder dezelfde goed gedefinieerde en reproduceerbare omstandigheden te doen plaats hebben, wil men vergelijkbare resultaten verkrijgen. Hierop werd reeds in 1910 door VAN DAM (8) bij zijn onderzoekingen over het rijpingsproces en den bouw van het zuivel van Edammer kaas de aandacht gevestigd en aangetoond, dat een te lage temperatuur waarbij, en een te korte tijd gedurende welke het kaas-water-mengsel geschud wordt, een veel te hoog cijfer voor de W.N. kunnen veroorzaken. Hieraan schijnt niet de nodige aandacht te zijn geschonken, althans wanneer men ziet, hoe zeer de dikwijls weinig gedefinieerde extractiemethoden, ook nog in de latere jaren, uiteenloopen.

Eerst in 1934 vonden we het laatstgenoemde onderzoek door VRONK (75) vermeld en kort geleden hebben ook de Deensche onderzoekers KNUDSEN en OVERBY (9) hierop nog eens gewezen en o.a. aangetoond, hoe belangrijk het is voor een goede wijze van extraheeren, om geruimen tijd machinaal te schudden en niet, zooals veelal geschiedt, „af en toe om te schudden”.

Met inachtneming van de genoemde onderzoekingen en van eigen ervaringen werd voor het hier besproken onderzoek tenslotte de volgende extractiemethode gekozen:

Een hoeveelheid der pas gemalen, eerst van de korst ontdane kaas, gewoonlijk 40 of 60 g, werd in 3 à 4 porties, telkens met 100 à 150 ml water van aanvankelijk 50° C in een mortier zachtjes aangewreven, overgebracht in een gewogen kolf van 1 of 1½ l en verder tot zóódanig gewicht aangevuld, dat — rekening houdende met het vochtgehalte der kaas — ten slotte de 12½-voudige hoeveelheid van het gebruikte kaasgewicht aan totaal water in het mengsel aanwezig was. Nadat per 100 ml water nog 0,2 ml van een 50 % thymoloplossing in alcohol was toegevoegd, werd de kolf in een grooten thermostaat met water van 25° C, waarin plaats was voor 4 zulke kolven, gedurende 16 uren of iets langer rond gewenteld. De inhoud werd vervolgens in met stoppen afgesloten centrifugebuizen van ± 100 ml inhoud bij 4000 toeren per min. gedurende ± 20 minuten gecentrifugeerd en, na verwijdering van de vetlaag, door vouwfilters gefiltreerd.

De filtraten waren steeds licht troebel of opaliseerend door fijne vetdruppeltjes; het N-gehalte der eerste, vrij troebele filtraten en dat der laatste, bijna heldere, was hetzelfde. Met het oog op door enzymwerking eventueel optredende veranderingen in het kaasextract, is het wenschelijk dit nog denzelfden dag in onderzoek te nemen. Bij de berekening der analyseresultaten werd aangenomen, dat 25 ml extract afkomstig was van 2 g kaas; de hierbij gemaakte fout door het iets van 1 afwijkend S.G. is veel kleiner dan de onvermijdelijke analysefouten en dus te verwaarloozen.

Om een indruk te geven van de reproduceerbaarheid en de grootte der onvermijdelijke fouten bij deze wijze van extraheeren, volgen hier eenige analyseresultaten, waarbij de van elk extract in duplo bepaalde W.N. in % van de T.N. der kaas, als contrôlemiddel werd gebezigd.

1. Bij 3 gelijktijdige extracties eener 4 maanden oude kaas werd gevonden 24,3 %, 24,4 % en 24,4 % W.N.

2. Bij gelijktijdige extracties van 20 en 40 g eener 8 maanden oude kaas was het resultaat 33,0 % en 33,4 % W.N.

3. In de 3 dagen na elkaar bereide extracten, afkomstig van eenzelfde bij 6° C bewaard monster gemalen zeer oude kaas, bedroeg de W.N. resp. 29,5 % en 29,4 %.

4. Een aldus 4 dagen bewaard monster van een 3 maanden oude kaas gaf aanvankelijk 22,5 %, daarna 22,7 % W.N.

5. In de extracten van een 2 maanden oude kaas werd op dezelfde wijze 6 dagen na elkaar 19,5 % en 19,6 % W.N. gevonden.

6. Hetzelfde toegepast op een 5½ maand oude gemalen kaas, 4 dagen na elkaar, gaf 36,4 % en 36,0 % W.N.

7. De aldus verkregen extracten van een kaas, die 11 maanden gerijpt was, bevatte 29,4 % en 29,6 % W.N.

Iets grootere verschillen gaven de volgende extracten van in jongeren toestand onderzochte kazen:

8. In een extract van 7 dagen oude kaas werd 11,8 % W.N. gevonden; 4 dagen later gaf een nieuw extract van de bij 6° C bewaarde gemalen kaas 12,2 % W.N.

9. Een kaas van 3 weken met 30,3 % W.N. gaf 4 dagen later, behandeld als in No. 8, 30,7 % W.N.

10. Een andere 3 weken oude kaas, alsvoren behandeld, leverde 24,7 %, resp. 25,1 % W.N. op.

11. In de extracten van dezelfde kaas als in 9, nu 8 weken oud, werd op den eersten dag 36,0 % W.N., op den volgenden dag, na 24 uren bewaren bij 6° C van het gemalen monster, 36,5 % W.N. gevonden.

12. Dezelfde kaas als in 10, maar nu 8 weken oud, leverde aldus, 2 dagen na elkaar geëxtraheerd, 30,8 % en 31,3 % W.N. op.

Uit de eerste 7 analyses blijkt, dat de reproduceerbaarheid der gevolgde methode zeer bevredigend is, daar de verschillen in W.N. niet meer dan 1 % der gevonden getalwaarden bedragen en verder ook, dat het gedurende eenige dagen bij 6° C bewaren van het gemalen kaasmonster de verschillen in W.N. niet deed toenemen. Uit de overige analyses blijkt, dat het

gewenscht is, vooral bij jonge kaas, steeds een extract van de versch gemalen kaas te bereiden en bijv. voor een herhaling, een volgenden dag bij voorkeur een nieuw monster te vermalen en te extraheeren.

2. *Bepaling der eiwitten en eiwitachtige stoffen in de kaasextracten*

Van de oorspronkelijke wrongeleiwitten kunnen de kaasextracten een zekere hoeveelheid para-caseïne bevatten in den vorm van oplosbare p-caseïnaten, die door inwerking van NaCl en eventueel ook van ammoniumzouten uit het calcium-p-caseïnaat in de kaas worden gevormd. Ook is het mogelijk, dat in de extracten kleine hoeveelheden nog onveranderd albumine en globuline der kaasmelk aanwezig zijn.

Als een der eerste splitsingsproducten der kaaseiwitten kan het uit p-caseïne, vermoedelijk door toedoen van het pepsine van het stremsel, gevormde para- of pseudo-nucleïne worden genoemd, dat volgens VAN SLIJKE en HART (10) steeds in de waterige extracten van rijpende kaas wordt aangetroffen. Van de samenstelling van het ps-nucleïne is nog altijd weinig meer bekend dan dat het een in water, alcohol en aether zeer slecht oplosbare eiwitachtige stof is, die bij inwerking van pepsine en zoutzuur op caseïne kan ontstaan en veel organisch gebonden phosphorus bevat. Volgens SAMUELY en STRAUSS (11) ontstaat bij voortgezette pepsine-inwerking tevens een in water en verdunde zuren oplosbaar product, dat door SALKOWSKI (12) „para-nucleïnezuur” werd genoemd en volgens hem $\pm 4\%$ P en $\pm 13\frac{1}{2}\%$ N zou bevatten. Overigens loopen de in de literatuur vermelde cijfers, over de samenstelling dezer stoffen zeer uiteen; deze schijnt in hooge mate afhankelijk te zijn van de bereidingswijze, zooals door SUTERMELSTER (13) wordt aangenomen, die evenals BRAILSFORD ROBERTSON (14) het product, dat gewoonlijk „ps-nucleïne” wordt genoemd, als een mengsel beschouwt van minstens 2 stoffen met verschillend P-gehalte; DIETRICH (15) bereidde zelfs 4 verschillende „ps-nucleïne-zuren” met 10 %, 4.1 %, 3.8 % en 3.9 % P.

Het door VAN SLIJKE en HART met „ps-nucleïne” bedoelde product was volgens hen de stof, die uit kaasextracten werd geprecipiteerd, wanneer per 100 ml 5 ml éénprocentig HCl werd toegevoegd en dan op 50°—55° werd verwarmd. Echter mag betwijfeld worden, of het precipitaat geheel, of zelfs voor een belangrijk deel, uit ps-nucleïne of ps-nucleïnezuur bestond ¹⁾. Het is toch zeer wel mogelijk, dat op deze wijze in min of meerdere mate ook p-caseïne uit de oplosbare p-caseïnaten neerslaat. Dit zal vooral afhangen van den in het mengsel door de HCl-toevoeging ontstanen pH, die zooals te verwachten is, door de uiteenlopende bufferende werking des kaasextracten vrij sterk zal kunnen verschillen. Inderdaad werden door mij in den loop van dit kaasonderzoek in een groot aantal volgens VAN SLIJKE en HART behandelde extracten pH's wisselend van 3.4 tot 4.5 gevonden.

¹⁾ In verband hiermee kan nog worden opgemerkt, dat VAN SLIJKE en PRICE in hun boek „Cheese” van 1927, dat een nieuwe bewerking is van „The Science and Practice of Cheese making” van VAN SLIJKE en PULOW van 1909, de in dit laatste werk dikwijls vermelde p-nucleïne-groep niet meer hebben genoemd en ook uit verschillende overigens herplaatste tabellen hebben weggelaten, zonder de reden hiervan te vermelden.

BRAILSFORD ROBERTSON (16) bespreekt de moeilijkheid om caseïne van de ps-nucleïnegroep te scheiden en volgens hem bestaat daarvoor geen betrouwbare methode. Ongetwijfeld geldt dit ook voor een p-caseïne-afscheiding uit tevens ps-nucleïne bevattende kaasextracten, daar volgens ROGERS (17) het iso-electrisch punt voor caseïne en p-caseïne bij dezelfde pH, n.m. 4,5—4,6 gelegen is. Een te samen min of meer volledig precipiteeren van p-caseïne en ps-nucleïne is bij toepassing der methode van SLIJKE en HART dus niet onwaarschijnlijk.

Béhalve deze onderzoekers zijn er andere geweest, die het wenschelijk hebben geacht, de in kaasextracten voorkomende eiwitten en eiwitachtige eerste ontledingsproducten af te zonderen en die naar precipiteermiddelen daarvoor hebben gezocht, welke de albumosen (proteosen) en de door verdere afbraak ontstane N-verbindingen nog in oplossing lieten blijven. EAGLES en SADLER (18) gebruikten hiervoor o.a. een methode, die zij ontleenden aan de door ORLA JENSEN (19) bij zijn onderzoekingen over melkzuurbacteriëncultures toegepaste werkwijze. Zij verhitten een mengsel van 50 ml extract, afkomstig van 5 g kaas, met 1 ml 1 % azijnzuur en 100 ml water gedurende 30 minuten in een kokend waterbad; na afkoeling werd tot 250 ml aangevuld en in het filtraat de z.g. „oplosbare N volgens ORLA JENSEN” bepaald.

Een andere groep van eiwitten en eiwitontledingsproducten werd geprecipiteerd volgens een werkwijze, toegepast door WASTENEYS en BORSOOK (20) bij een onderzoek over de gefractioneerde analyse van producten der onvolledige enzymatische hydrolyse van eiwitten, o.a. van albumine en globuline. EAGLES en SADLER (18) voegden bij 150 ml kaas-extract 30 ml „trichloorazijnzuur 20 %” en filtreerden na 1 uur af van het verkregen neerslag. De in het filtraat bepaalde N noemden zij „oplosbare stikstof volgens W. en B”. Het neerslag bevatte volgens hen de „oplosbare proteïne N” der kaas; de hiervoor berekende cijfers waren steeds hoger dan de hoeveelheden N, die in de precipitaten volgens de methode O.J. werden gevonden.

Ook andere onderzoekers pasten later de trichloorazijnmethode toe, maar gebruikten niet steeds dezelfde concentratie als EAGLES en SADLER, die — wanneer zij met „20 % trichloorazijnzuur” 20 g per 100 ml bedoelen — $3\frac{1}{2}$ g daarvan per 100 ml eindvolume hebben aangewend. Zoo werkte KELLY (21) met 2 g, DAVIS (22) met 4 g, terwijl SHERWOOD en WHITEHEAD (2) weer met $3\frac{1}{2}$ g per 100 ml eindvolume experimenteerden, zonder dat zij bij deze analyses iets hebben vermeld van een mogelijken invloed der concentratie van het trichloorazijnzuur op de hoeveelheid der precipiteerende N-verbindingen. Waarschijnlijk zijn zij uitsluitend afgegaan op de meening van WASTENEYS en BORSOOK, dat uit hun oplossingen met trichloorazijnzuur slechts „proteïnen en metaproteïnen” en geen proteosen (albumosen) precipiteerden. Echter zijn HAMMERSTEN (23) en LLOYD en SHORE (24) van meening, dat de albumosen wel, de peptonen niet met trichloorazijnzuur neerslaan. WINTERSTEIN en BISSEGER (25) gebruikten dit reagens naast $\text{Cu}(\text{OH})_2$, tannine of basisch loodacetaat om de „totale eiwitstikstof” in met water gedigereerde kaas te bepalen, waarbij zij telkens nagenoeg gelijke uitkomsten verkregen. Tot die totale eiwitstikstof werd

door hen echter alle N gerekend te behooren, die *niet* van de aminozuren, aminen en ammoniumverbindingen afkomstig was. Tot de wateroplosbare „eiwitstoffen” behoorden volgens hen bijv. ook die „peptonen” en „polypeptiden”, welke met basisch loodacetaat neerslaan.

Bij het nagaan van den invloed der trichloorazijnzuurconcentratie op de uit kaasextracten precipiteerende hoeveelheid N-verbindingen, is ons gebleken, dat deze invloed zeer groot is en dat bij toenemende hoeveelheden precipiteermiddel de neergeslagen hoeveelheden N sterk stijgen. Eenige voorbeelden daarvan, op extracten van uit verschillende melk bereide kazen toegepast, vindt men in tabel I. De daarin vermelde hoeveelheden trichloorazijnzuur werden per 50 ml extract, afkomstig van 4 g kaas, toegevoegd.

TABEL I

40+ kaas 14 dagen oud T. N 3,90 % W. N 15,1 % van de T. N		40+ kaas 4 maanden oud T. N 4,55 % W. N 20,4 % van de T. N		40+ kaas 7½ maand oud T. N 4,72 % W. N. 33,5 % van de T. N	
Trichloorazijn- zuur in g per 100 ml eind- volume	Geprecipi- teerde N in % der W. N	Trichloor- azijnzuur in g per 100 ml eindvolume	Geprecipi- teerde N in % der W. N	Trichloor- azijnzuur in g per 100 ml eindvolume	Geprecipi- teerde N in % der W. N
2,6	37,8	1	23,2	2,6	23,2
3,5	40,0	3	29,4	3,5	25,8
4,3	41,7	5	33,6	3,9	26,4
5,2	43,2	8	35,9	4,3	27,1
6,9	45,4	12	38,4	5,2	28,1
9,5	48,5	16	39,7	6,9	30,2
12,1	50,5	20	40,9	8,7	31,2

Overall is in de tabel, bij verhooging der hoeveelheid trichloorazijnzuur, een voortdurende stijging der geprecipiteerde N merkbaar en in één der drie gevallen was zelfs na toevoeging van 16 g reagens het maximum nog niet geheel bereikt, ofschoon slechts 37 mg totaal N in het behandelde kaasextract aanwezig was. Reeds alleen de zeer hoge percentages geprecipiteerde N maken het waarschijnlijk, dat behalve de eiwitten en eiwitachtige stoffen ook de albumosen geleidelijk mee zijn gaan precipiteeren. Een bepaalde concentratie, waarbij de precipitatie der albumosen plotseling zou beginnen, is volgens de getallenreeksen der tabel niet aan te geven. Het is volgens dit alles niet aannemelijk, dat met de door EAGLES en SADLER en de andere onderzoekers gebruikte wisselende trichloorazijnzuurconcentraties, in kaasextracten uitsluitend eenzelfde groep, slechts eiwitachtige stoffen en geen albumosen bevattend, zou neerslaan, die speciaal den naam: „oplosbaar proteïne” zoude verdienen ¹⁾.

¹⁾ Zie hierover ook het later bij tabel III medegedeelde.

Evenmin kan de methode ORLA JENSEN, op kaasextracten toegepast, den waarborg geven, dat daarmee steeds dezelfde eiwitgroepen precipiteeren, daar de pH's, die dan in verschillende extracten ontstaan, niet onbelangrijk uiteenloopen, zooals uit het onderzoek met deze werkwijze, toegepast op 12 kaasextracten, bleek, waarbij de pH wisselde van 4.2 tot 4.6. Ook verder literatuuronderzoek maakte het wel zeer waarschijnlijk, dat een eenigszins quantitative afzondering der onveranderde melkeiwitten alleen en ook een scheiding der verschillende nog weinig bekende eiwitachtige stoffen, die in de extracten voorkomen, nog tot de onmogelijkheden behoort.

Men zal er zich dus toe moeten bepalen, om al deze stoffen te zamen, als één belangrijke groep eiwitachtige bestanddeelen der kaasextracten, zoo goed mogelijk van de albumosen, peptonen, aminozuren en ammoniumverbindingen af te zonderen.

Om hiertoe te komen, schijnt het mogelijk om van een reeds in de oudere literatuur (26) en ook later (27) genoemd kenmerkend verschil tusschen de eiwitachtige stoffen en de albumosen (en lagere afbraakproducten) gebruik te maken, namelijk hierin bestaande, dat de eerste bij verwarming met verdunde zuren onder bepaalde omstandigheden wel, de albumosen niet precipiteeren.

We zullen dan echter bij toepassing daarvan die omstandigheden en ook de wijze van behandeling nader moeten vastleggen, bijv. wat den pH en de temperaturen betreft.

Nu zijn de eigenschappen der te precipiteeren eiwitachtige stoffen wel ten deele nog onbekend, maar toch weten we, dat in het algemeen de kans op coagulatie van zulke hydrophiele colloïden groot is, wanneer we door verwarming de dehydratatie der deeltjes bevorderen, waardoor ze een meer hydrophoob karakter met grootere uitvlokkingsneiging aannemen, en we dan voor hun min of meer volledige ontlading zorgen, door den pH der oplossing in de buurt van hun iso-electrisch punt te brengen (28, 29).

De hier te beschrijven werkwijze berust dan ook op dit principe en op de overweging, dat elk kaasextract binnen een optimaal temperatuurgebied op een zóódanigen pH gebracht zal kunnen worden, dat de coagulatie der eiwitachtige stoffen maximaal is. Na eenige oriënteerende proeven werd als volgt gehandeld, om het N-gehalte der zoo volledig mogelijk te coaguleeren eiwitachtige stoffen, kortweg „maximaal coaguleerbare N” genoemd, te bepalen.

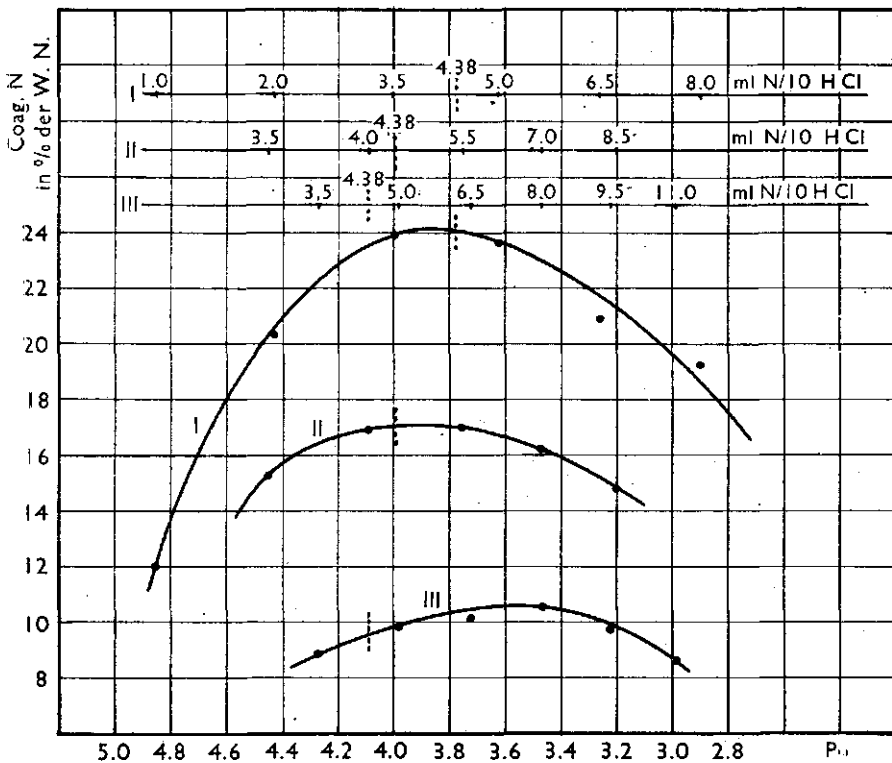
Bij 5 à 6 porties à 80 ml extract eener kaas worden in maatkolfjes van 100 ml stijgende hoeveelheden N/4 HCl gevoegd, die men na eenige ervaring gemakkelijk zóó kan kiezen, dat onder de hierdoor ontstane zuurheidsgraden ook die pH voorkomt, waarbij de geprecipiteerde hoeveelheid eiwitachtige stoffen het grootst zal blijken te zijn. De kolfjes worden gedurende $\frac{1}{2}$ uur op $\pm 55^{\circ}$ C verwarmd en den volgenden dag tot 100 ml aangevuld; in 80 ml der filtraten wordt dan het N-gehalte bepaald. Hieruit kan dan de N der in de verschillende kolfjes geaguleerde hoeveelheden eiwit en eiwitachtige stoffen berekend worden, uitgedrukt in procenten van het N-gehalte van het extract (W.N.) of de totaal-N der kaas (T.N.).

Voor de berekeningen is het doelmatig om alle gevonden N-waarden eerst om te rekenen op een hoeveelheid extract, afkomstig van 1 g kaas.

Bij benadering reeds uit de gevonden reeks N-cijfers, maar nauwkeuriger uit een curve, het verband aangevende tusschen de in de filtraten bepaalde pH's en de daarbij behorende hoeveelheden geprecipiteerde-N-cijfers (in % v/d W.N.) kan de „maximaal coaguleerbare N” worden afgelezen ¹⁾.

De voor de coagulatie gekozen temperatuur berust op een aantal proeven, waarbij bleek, dat bij belangrijk hogere temperatuur, bijv. 80° of 100° C, lagere uitkomsten werden verkregen en dat bij 40° en vooral bij 25° de coagulatie minder vlot verliep en ook de uitkomsten lager waren dan bij 55°. Overigens bleek het maximum van precipitatie niet gevoelig voor geringe temperatuursverschillen, zoodat het voldoende is de temperatuur tusschen 55° en 60° te houden gedurende een half uur of iets langer, wanneer de precipitatie wat traag verloopt. Dit laatste heeft ook plaats, wanneer de kleinste concentratie van het HCl zeer laag wordt gekozen; ook ontstaat er dan soms, zelfs na langen tijd verwarmen, geen filtreerbaar neerslag.

Figuur 1



¹⁾ Zie ook de opmerking aan het eind van de bespreking dezer methode (blz. 232).

In de volgende tabel II en de bijbehorende grafiek (fig. 1) worden als voorbeeld de resultaten weergegeven van de bepalingen der max. coag. N in de extracten I, II en III van eenige in de kaasmakerij der Proefzuivelboerderij op normale wijze in één bak bereide 40+ kazen, nadat deze resp. 6 weken, 3 en 6 maanden waren gerijpt.

De curven zijn zóó geconstrueerd, dat bij een vloeiend verloop de punten, die de gevonden N-cijfers vertegenwoordigen, daarin zooveel mogelijk konden worden opgenomen. Boven de curven zijn in de horizontale lijnen I, II en III de punten aangegeven, die de toegevoegde hoeveelheden N/4 HCl voorstellen, welke de pH's deden ontstaan, die door de ordinaten behorende bij die punten worden bepaald.

Daar volgens de methode van SLIJKE en HART per 80 ml extract steeds een hoeveelheid HCl wordt toegevoegd, overeenkomende met 4,38 ml N/4 HCl, kunnen ook de hoeveelheden „ps-nucleïne N”, die bij toepassing dezer methode zouden gevonden zijn, met behulp van de N/4 HCl-lijnen, uit de curven worden afgeleid, als ook de pH's der daarbij behorende filtraten. Dit is in de fig. 1 door verticale stippellijntjes aangeduid. Ook in de tabel II zijn deze ps-nucleïne-cijfers naast die van de max. coag. N vermeld ter vergelijking.

TABEL II

ml N/4 HCl toegevoegd per 80 ml kaasextract			Geprecipiteerde hoeveelheid N in % van de W. N			pH bepaald in de filtraten			Max. coag. N volgens fig. 1 in % van de W. N			„Ps-nucleïne-N” volgens fig. 1 in % van de W. N		
I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1,0	2,5	3,5	12,0	15,2	8,8	4,85	4,45	4,27	24,1	17,2	10,5	24,1	17,1	9,4
2,0	4,0	5,0	20,3	16,9	9,8	4,43	4,09	3,98	pH behoorend bij de max. coag. N			pH behoorend bij de „ps-nucleïne N”		
3,5	5,5	6,5	23,9	17,0	10,1	4,00	3,75	3,72						
5,0	7,0	8,0	23,6	16,2	10,5	3,62	3,47	3,47	I	II	III	I	II	III
6,5	8,5	9,5	20,9	14,8	9,7	3,26	3,20	3,22						
8,0	—	11,0	19,2	—	8,6	2,90	—	2,99	3,80	3,85	3,60	3,80	4,00	4,10

Het vloeiend verloop der curven met één duidelijk maximum maakt het waarschijnlijk, dat in de kaasextracten een vrij groot aantal eiwitachtige stoffen, met gradueel zich wijzigende eigenschappen, aanwezig zijn en niet slechts enkele, wier karakter sterk uiteenloopt. In dit laatste geval alleen, zou dan bij de pH's van hunne iso-electrische punten een versterkte precipitatie door neiging tot herhaalde topvorming in de curven verwacht kunnen worden, wat nooit het geval bleek te zijn bij het groote aantal gevallen, dat in den loop van dit onderzoek werd nagegaan. Wel waren de maxima, vooral bij extracten van reeds sterk gerijpte kazen,

meermalen zeer vlak, zoodat kleine verschillen in de toegevoegde hoeveelheden HCl weinig verandering gaven in die der gecoaguleerde N, zooals ook reeds te zien is bij vergelijking der curven I en III van fig. 1.

De pH's, waarbij de maximale coagulatie plaats had, waren in den regel iets lager voor de extracten van oude kazen dan van jonge. Bij 81 bepalingen in allerlei extracten vielen die pH's tusschen de grenzen 3,55 en 4,20, terwijl de pH's, waarbij de „ps-nucleïne” geprecipiteerd werd, varieerden van 3,4 tot 4,5. De „ps-nucleïne”-N-waarden bleken in ieder onderzocht kaasextract lager te zijn dan, of hoogstens gelijk aan, die der max. coag. N.

Wanneer de pH's der „ps-nucleïne”- of der max. coag. eiwitfiltraten op den pH van het iso-electrisch punt van caseïne, dus op 4,5—4,6 werden gebracht, werd na verwarming op 40° C geen neerslag verkregen. Evenmin gaf verhitting op 100° C gedurende een half uur in de laatstgenoemde filtraten ooit een precipitaat, hoogstens een enkele keer een zwakke opalescentie. De „ps-nucleïne”-filtraten daarentegen vertoonden na deze behandeling meermalen een vlokkig neerslag.

Ter vergelijking van eenige max. coag. N-waarden met de uitkomsten, die volgens de hiervoor besproken trichloorazijnzuurmethode voor de „oplosbare proteïne-N” gevonden zijn, kunnen de volgende cijfers dienst doen, die alle in procenten der W.N. zijn uitgedrukt en in tabel III zijn verenigd.

TABEL III

Extract van kaas	Ouderdom der kaas	Maximaal coaguleerbare eiwit - N	N van het neerslag met trichloorazijnzuur					
			g reagens per 100 ml eindvolume					
			1	2	3	4	6	8
P I	4 weken	29,2	32,9	36,5	39,4			
P II	2 maanden	23,2	30,0	33,1	35,8			
P III.	3 maanden	17,0	23,3	—	29,0			
S 5	3 maanden	19,4	—	26,5	29,3	31,4	33,4	35,2
T	3½ maand	11,9	16,7	20,2	22,8			
WX'	8 maanden	12,4	16,0	20,8	23,5			

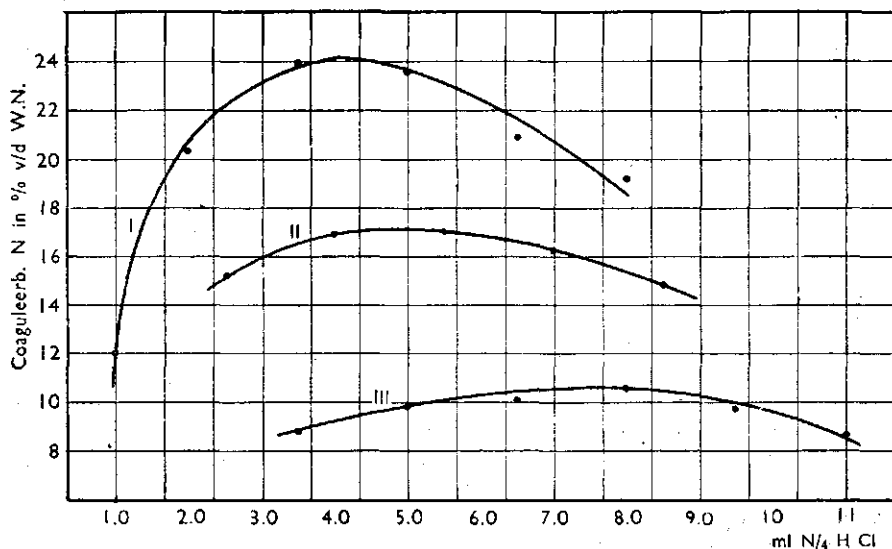
We zien uit deze cijfers, dat reeds de met 1 g reagens geprecipiteerde hoeveelheid N steeds meer bedraagt dan de max. coag. N en dat de met 3 g reagens neergeslagen hoeveelheid $1\frac{1}{2}$ à 2 maal zoo groot is. Bij toepassing der door EAGLES en SADLER gebruikte methode, n.m. met toevoeging van $3\frac{1}{2}$ g trichloorazijnzuur per 100 ml eindvolume, zou de hoeveelheid N der „oplosbare proteïnen” zeker ook aanzienlijk hoger zijn uitgevallen dan van het max. coag. eiwit. De eerstgenoemde groep zal dus meer N-verbindingen moeten bevatten dan alleen eiwitten en eiwitachtige stoffen, wanneer we hieronder samenvatten, die N-verbindingen

der kaasextracten, welke bij verwarming in verdund zoutzure oplossing, onder de meest gunstige omstandigheden neerslaan. Hierdoor en wegens het vroeger reeds medegedeelde wordt het waarschijnlijk, dat de met trichloorazijnzuur bij toenemende concentratie in steeds meerdere mate precipiteerende N-verbindingen, althans gedeeltelijk uit albumosen zullen bestaan, die zooals bekend, met HCl niet coaguleerbaar zijn. Wegens de onzekerheid over de juiste trichloorazijnzuurconcentratie, die gebruikt zou moeten worden om in elk afzonderlijk geval steeds slechts een bepaalde groep N-verbindingen, bestaande uit eiwitten en eiwitachtige stoffen, af te zonderen, schijnt de methode met dit reagens, althans voor kaasextracten, minder geschikt en moet daarom aan de methode der „max. coag. N” de voorkeur worden gegeven. Overigens dient deze laatste methode slechts beschouwd te worden als een werkwijze om het gestelde doel: het op goed reproduceerbare wijze bepalen der totale-N-hoeveelheid van alle in kaasextracten aanwezige eiwitten en eiwitachtige stoffen, zoo dicht mogelijk te benaderen.

Ten slotte zij nog op het volgende de aandacht gevestigd:

Terwijl voor de uitwerking der max. coag. N-methode en de vergelijking der uitkomsten met andere werkwijzen het verband tusschen den pH en de hoeveelheid geprecipiteerde N van primair belang was, is het voor de praktische toepassing der nieuwe methode voldoende, het verband na te gaan tusschen de telkens toegevoegde opklimmende hoeveelheden $N/4$ HCl en de daarmee coaguleerbare N. Men heeft dan het voordeel, de pH-bepalingen in de filtraten achterwege te kunnen laten.

Figuur 2



Als voorbeeld daarvan zijn de curven, die men aldus voor de zuivere bepaling der maxima kan construeeren voor de in tabel II bedoelde kaasextracten I, II en III, weergegeven in fig. 2.

3. *Bepaling der aminozuurstikstof*

a. *De phosphorwolfraamzuurmethode.* De dikwijls toegepaste werkwijze, om in oplossingen van ten deele gehydrolyseerd eiwit de eiwitachtige stoffen, de albumosen en de peptonen gezamenlijk te scheiden van de aminozuren met behulp van phosphorwolfraamzuur, waarmee, behalve de eerstgenoemde drie groepen, tevens de ammoniumzouten neerslaan, is reeds zeer oud.

Zoo werd zij reeds in 1894 door BONDZYNSKI (30) en in 1896 door STUTZER (31) gebruikt, om in kaasextracten door precipitatie van de „oplosbare eiwitstoffen” der kaas — waaronder zij toen ook nog de albumosen en peptonen rangschikten — deze „eiwitstoffen” van de in oplossing blijvende „eiwitontledingsproducten”, in hoofdzaak aminozuren, te scheiden.

Reeds spoedig had men echter bij andere onderzoekingen, zooals die van DRECHSEL (32), HAUSMANN (33), KUTSCHER (34), WINTERSTEIN en BISSEGER (25) e.a. over het aminozuurgehalte van eiwithydrolysaten, bemerkt, dat de phosphorwolframaten van sommige basische aminozuren, die aanvankelijk — zooals nog wel geschiedt — tot de groep der „basen” of „hexonbasen” werden gerekend, zich sterk van de mono-aminozuur-phosphorwolframaten onderscheiden door een veel geringere oplosbaarheid. Voor de splitsingsproducten van caseïne is dit het geval met de drie basische aminozuren arginine, histidine en lysine, evenals met cystine, dat, ofschoon evenveel basische als zure groepen bevattend, ook dikwijls ten onrechte tot deze groep wordt gerekend (35, 36, 42), terwijl zij alle vier ook wel als „diaminozuren” worden aangeduid, hoewel dit althans voor histidine, dat één amino- en een imidazolgroep bevat, minder juist schijnt. Het verschil in oplosbaarheid der phosphorwolframaten van de genoemde 4 aminozuren en van die der mono-aminozuren is zelfs zóó belangrijk, dat bij de betrekkelijk groote concentraties aan aminozuren, die bij het onderzoek van door verhitting met sterke zuren verkregen volledige eiwithydrolysaten gebruikelijk zijn, men met behulp van phosphorwolfraamzuur onder bepaalde omstandigheden een vrij volledige scheiding dezer twee groepen aminozuren kan bereiken. De absolute hoeveelheid der als phosphorwolframaten in een bepaald volume in oplossing blijvende basische aminozuren en cystine is dan slechts gering in vergelijking met de oorspronkelijke in dat volume aanwezige hoeveelheid totaal aminozuur. Zoo werden bij de toepassing der „N-distributie methode” volgens VAN SLIJKE in het filtraat van een met phosphorwolfraamzuur behandelde oplossing, die 150 à 200 mg totaal aminozuur N bevatte per 100 ml eind-volume, slechts enkele milligrammen basische aminozuur- en cystine N terug gevonden.

Bij het onderzoek van kaasextracten daarentegen heeft men, zooals nog nader zal blijken, met vele malen kleinere concentraties aan aminozuur te doen, zoodat de na de phosphorwolfraamzuurbehandeling (tegelijk met alle mono-aminozuur N) in het filtraat terecht komende hoeveelheid N der basische aminozuren en van cystine, hoewel op zichzelf gering, toch nog een zeer belangrijk deel kan uitmaken der oorspronkelijk in het extract aanwezige totale N-hoeveelheid der laatstgenoemde aminozuren.

De vraag, waarom het bij deze methode van aminozuur-N-bepaling in kaasextracten in hoofdzaak gaat, is dus, of het oplosbare deel phosphorwolframaat-N der basische aminozuren en van cystine groot genoeg is, om het tekort aan aminozuur- of „afbraak-N” in het filtraat tot kleine afmetingen te beperken. Hierover is, met behulp van in de literatuur bekende gegevens en de door eigen onderzoek bij kaasextracten verkregen cijfers, het volgende gebleken.

Over de oplosbaarheid der phosphorwolframaten van verschillende basische aminozuren en van cystine, zoo belangrijk voor de beoordeeling der waarde van de hierbedoelde methode, zijn vele onderzoeken gedaan, zooals door GULEWITSCH (37), OSBORNE en HARRIS (38), DRUMMOND (39) e.a., waarvan de resultaten nogal uiteenloopen, een gevolg van de verschillende omstandigheden, waaronder en het milieu, waarin de precipitatie plaats had.

VAN SLIJKE (40) heeft in 1911 zijn „N-distributiemethode” voor *volledige* eiwithydrolysaten uitgewerkt op den grondslag van de door HAUSMANN (33) in 1899 gepubliceerde werkwijze en daarbij, na verwijdering der huminestoffen en van ammoniak, de mono- en de basisch-aminozuurgroepen door precipitatie met phosphorwolframaamzuur in zoutzure oplossing van elkaar gescheiden, waarbij ook cystine met de hexonbasen grootendeels neersloeg. Daar hij zelf overtuigd was, dat deze precipitatie niet quantitatief verliep, heeft hij door een afzonderlijk onderzoek de oplosbaarheid van de phosphorwolframaten dezer N-verbindingen bepaald en daarvoor correcties vastgesteld, om na het onderzoek te worden aangebracht. De correcties bedroegen per 100 ml eindvolume, waarin de precipitatie had plaats gevonden: 1,6 mg arginine N, 1,9 mg histidine N, 1,3 mg cystine N en 0,25 mg lysine N.

De juistheid dezer cijfers werd door anderen betwijfeld, zooals door VICKERY en LEAVENWORTH (41), die een grootere oplosbaarheid van argininephosphorwolframaat vonden, en door DAVIES (42), die de correcties voor arginine en histidine te laag achtte.

MITCHELL en HAMILTON (43) wezen er op, dat nog nooit was onderzocht, in welke mate de oplosbaarheid afhankelijk was van de concentratie, doch THIMANN (44) heeft dit later uitvoerig onderzocht voor arginine-, histidine- en lysinephosphorwolframaat. Hij constateerde, dat de concentratie van elk dier aminozuren van grooten invloed was op de hoeveelheid van het phosphorwolframaat, die na toevoeging van het reagens nog in oplossing bleef.

Belangrijk was ook de waarneming van THIMANN, dat het *percentage* phosphorwolframaat-N, dat na de behandeling eener basisch-aminozuuroplossing met phosphorwolframaamzuur in een bepaald volume in oplossing bleef, des te grooter bleek te zijn, naarmate de oorspronkelijke concentratie van dit aminozuur geringer was geweest. Gedeeltelijk uit de cijfers, die hij geeft, gedeeltelijk uit een daarbij behoorende grafiek, is bijv. af te leiden, — dat bij een eindvolume van 23 ml — van 2,87 mg arginine N slechts 17 %, maar van 0,58 mg reeds 50 % in oplossing bleef. Van 0,85 mg histidine N werd per 23 ml eindvolume 52 % niet geprecipiteerd, doch van 0,60 mg zelfs 80 %. Het lysine-phosphorwolframaat is, ook bij

zeer geringe concentraties zeer weinig oplosbaar; zoo bleef van 0,7 mg lysine N per 23 mg eindvolume slechts 8 %, van 0,3 mg 13 % in oplossing.

Dit onderzoek van THIMANN schijnt, ook wegens de kleine concentraties, waarvoor de oplosbaarheidscijfers nog uit zijn grafiek zijn af te leiden, bijzonder geschikt om bij het toepassen der phosphorwolframzuurmethode op kaasextracten, er eenigermate over ingelicht te worden, welk deel der aminozuur-N in het precipitaat terecht komt en dus als afbraak N niet meer mee bepaald kan worden in het filtraat.

Hiervoor werd eerst nagegaan, hoeveel totaal aminozuur N volgens de in den loop van ons onderzoek verkregen cijfers, gemiddeld aanwezig was in 50 ml extract van kazen van verschillende ouderdom, daar bij de afbraak-N-bepalingen gewoonlijk van deze hoeveelheden werd uitgegaan.

Bij 5 Edammer 40+ kazen, die 5 à 5½ maand oud waren, bleek gemiddeld 16 mg en bij 3 andere, 10 à 16 maanden oud, gemiddeld 23 mg totaal aminozuur N in 50 ml extract en dus in het na de behandeling met phosphorwolframzuur verkregen eindvolume van 100 ml aanwezig te zijn.

Nu kan uit de door ROGERS (45) en door SUTERMEISTER (46) gegeven overzichten der cijfers, welke door VAN SLIJKE (1914), CROWTHER en RAISTICK (1916), DUNN en LEWIS (1921), HOFMANN en GORTNER (1925) en JONES en GERSDORFF (1931) zijn aangenomen voor het N-gehalte der bestanddeelen van volledig gehydrolyseerde caseïne, als gemiddelde waarde voor het totale basisch-aminozuur- en cystine-N-gehalte 24,8 % en voor het totaal aminozuur-N-gehalte 81,4 % der caseïne N berekend worden, terwijl de arginine N 8,97 %, de histidine N 6,28 %, de lysine N 8,73 % en de cystine N slechts 0,77 % ¹⁾ der caseïne N uitmaakt. Hieruit volgt, dat het gehalte der totale aminozuur N aan arginine N 11 %, aan histidine N 7,7 %, aan lysine N 10,7 % en aan cystine N 0,9 % bedraagt.

Wanneer deze „N-distributie” ook voor kaasextracten bij benadering geldig is, vinden we voor de 5 à 5½ maands kazen per 16 mg totaal-aminozuur N in de 100 ml eindvolume: 1,76 mg arg. N, 1,23 mg hist. N, 1,71 mg lys. N en 0,14 mg cyst. N. Voor de zeer oude kazen worden deze waarden 2,53 mg arg. N, 1,77 mg hist. N, 2,46 mg lys. N en 0,21 mg cyst. N. Om uit te maken, hoeveel procent van deze aminozuur N als phosphorwolframaat wordt geprecipiteerd, kunnen we nu, na de bovenstaande getallen voor de 5 à 5½ maands kazen op 23 ml (in plaats van 100 ml) eindvolume te hebben omgerekend, waardoor we vinden: 0,40 mg arg. N, 0,28 mg hist. N en 0,39 mg lys. N, gebruik maken van de genoemde grafiek van THIMANN. Behalve voor cystine, dat niet in zijn onderzoek is betrokken, vinden we aldus voor de bedoelde N in het *neerslag*: ± 35 % der arginine N, 0 % der histidine N en ± 88 % der lysine N. Dit toepassende op de per 50 ml extract en 100 ml eindvolume aanwezige basisch-aminozuur N, is in het precipitaat aanwezig: 35 %

¹⁾ Deze waarde is waarschijnlijk te laag, daar cystine bij de hydrolyse met sterke zuren gedeeltelijk wordt afgebroken. Volgens VAN SLIJKE (47) wordt slechts ± 50 %, volgens GORTNER en SANDSTROM (48) ± 65 % der oorspronkelijke cystine N terug gevonden. Hoe dit bij de enzymatische eiwitplitsing, zooals bij de kaasripping, in zijn werk gaat, is niet bekend.

van 1,76 mg of 0,62 mg arg. N, geen hist. N en 88 % van 1,71 mg of 1,51 mg lysine N, zoodat, afgezien van de zeer geringe oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid cystine N, die volgens VAN SLIJKE's onderzoek waarschijnlijk geheel in oplossing zal blijven, te zamen 2,13 mg basisch-aminozuur N of ± 13 % van de 16 mg totaal aminozuur N *niet* bij de afbraak N in het filtraat zou worden aangetroffen.

Op dezelfde wijze vinden we voor de extracten der oude kazen, dat van de 2,53 mg arg. N ± 55 % of 1,39 mg N, van de 1,77 mg hist. N ± 5 % of 0,09 mg N en van de 2,46 mg lysine N ± 90 % of 2,21 mg in het neerslag blijven en waarschijnlijk geen cystine N, zoodat in het geheel 3,69 mg of ± 16 % der 23 mg totale aminozuur N aan de bepaling der afbraak N zou ontsnappen.

Als eerste oriëntering over een mogelijk tekort aan afbraak N hebben deze cijfers wel eenige waarde, doch de volgende overwegingen maken het zeer waarschijnlijk, dat dit tekort aanzienlijk lager zal zijn. In de eerste plaats wordt het in de kaas gevormde arginine volgens WINTERSTEIN (25) bij de verdere rijping voor een groot deel gesplitst, waarschijnlijk in guanidine en ornithine; dit laatste wordt verder tot tetramethyleendiamine afgebroken. Arginine zou zelfs in rijpe Emmenthaler kaas niet voorkomen. Wanneer we nu aannemen, dat in 5 maanden en langer gerijpte Edammers de arginine grootendeels is verdwenen en het phosphorwolframaat van het restant practisch geheel in het filtraat terecht komt, dan blijkt, bij een herhaling der vorige berekeningen, het tekort aan totaal-aminozuur-N reeds eenige procenten kleiner te zijn geworden, n.m. 11 à 12 %.

Belangrijker is echter het volgende. Tot de speciale maatregelen, die bij het onderzoek van *volledige* zuurhydrolysaten van eiwitstoffen langzamerhand noodig zijn gebleken, om de *daarbij* gebruikelijke scheiding in basische- en monoaminozuren zoo volledig mogelijk te doen zijn, behoort ook de afkoeling bij het precipiteeren met phosphorwolframaazuur tot lage temperatuur en het 24 uur laten staan, liefst bij 0° C, alvorens af te filtreren. Volgens VAN SLIJKE (47) is namelijk de oplosbaarheid der basisch-aminozuur-phosphorwolframaten bij kamertemperatuur 4 maal zoo groot als bij 0° C, terwijl HANKE en KOESSLER (49) hebben gevonden, dat de afscheiding van het histidine-phosphorwolframaat zeer traag verloopt en dat de oplosbaarheid er van bij 30° C vijf maal zoo groot is als bij 0° C. CAVET (50) gaf voor de scheiding der 2 groepen aminozuren een nauwkeurig voorschrift, waarbij hij ook een lage precipitatie-temperatuur en 48 uren laten staan bij 0° C vóór de filtratie aanbeval.

Ook THIMANN heeft bij zijn bovenvermelde oplosbaarheidsbepalingen de buizen, waarin de precipitatie geschiedde, 24 uur in ijs laten staan, alvorens het neerslag af te centrifugeeren. Bij het onderzoek van kaas-extracten, waarbij het gewenscht is, zooveel mogelijk aminozuur N in het filtraat te krijgen, en waarbij de behandeling met phosphorwolframaazuur bij kamertemperatuur pleegt te geschieden, is het dus wel zeker, dat daarbij de werkelijke oplosbaarheid der phosphorwolframaten belangrijk groter zal zijn dan onze uit THIMANN's grafiek berekende waarden. Waarschijnlijk zal dus het tekort aan aminozuur N bij de bepaling der afbraak N belangrijk minder dan 11 % à 12 % van de gevonden waarde bedragen

er hoofdzakelijk slechts uit een gedeelte der totale lysine N bestaan, die volgens het voorgaande in het geheel 10 à 11 % van de totale aminozuur N uitmaakt.

Bij de toepassing der phosphorwolfraamzuurmethode op kaasextracten moet er in de eerste plaats op worden gelet, dat er een voldoende hoeveelheid reagens wordt toegevoegd om alle oplosbare eiwitten en eiwitachtige stoffen, benevens de albumosen en peptonen, zoo volledig mogelijk te precipiteeren, waarom volgens BRAILSFORD ROBERTSON (51), voor zoover het de eiwitachtige stoffen betreft althans, een groote overmaat reagens noodzakelijk is, wegens de sterke neiging tot hydrolytische splitsing der eiwit-phosphorwolfraamzuurverbindingen. Ook de ammoniumzouten en eventueel aanwezige aminen kunnen zoodoende worden neergeslagen.

Bij ons onderzoek werd steeds van 50 ml kaasextract, afkomstig van 4 g kaas, uitgegaan en na toevoeging van 30 ml zwavelzuur (1 vol. sterk zwavelzuur op 3 volumina water), zóóveel ml van een oplossing met 50 g phosphorwolfraamzuur per 100 ml onder omschudden bijgedruppeld, dat alle niet-aminozuur-N-verbindingen daarmee zoo volledig mogelijk werden geprecipiteerd. Na onmiddellijke aanvulling tot 100 ml en menging werd het kolfje weggezet en den volgende dag in 80 ml van het filtraat de N als „afbraak N” bepaald.

Over het al of niet voldoende zijn der hoeveelheid toegevoegd phosphorwolfraamzuur kan men geen zekerheid verkrijgen door, zooals wel wordt gedaan, na bezinking van het neerslag in de er boven staande heldere vloeistof met enkele druppels reagens te probeeren, of daarmee direct of na enkele minuten een nieuwe troebeling ontstaat. Bij ons onderzoek is namelijk gebleken, dat voor het tot stand komen van zulk een tweede neerslag soms vele uren vereischt worden. Het was dus noodig, om zich eerst langs analytischen weg te oriënteren over de minimum hoeveelheden phosphorwolfraamzuur, noodzakelijk voor de maximale precipitatie der niet-aminozuur N uit verschillende extracten met sterk uiteenlopende N-gehalten.

TABEL IV

Kaas 15 dagen oud W. N 16,7 % van de T. N		Kaas 4 maanden oud W. N 25,2 % van de T. N		Kaas 13 maanden oud W. N 29,5 % van de T. N	
Ph. wolfr.z. toegevoegd per 50 ml extract in grammen	N in het filtraat („afbraak-N”) in % der W. N	Ph. wolfr.z. toegevoegd per 50 ml extract in grammen	N in het filtraat („afbraak-N”) in % der W. N	Ph. wolfr.z. toegevoegd per 50 ml extract in grammen	N in het filtraat („afbraak-N”) in % der W. N
0,25	29,6	1,25	29,9	1,25	45,6
0,35	26,6	2,50	26,5	2,50	39,5
0,50	25,4	3,50	25,4	3,75	38,7
0,75	24,6	4,50	25,3	5,00	38,2
1,00	23,6	—	—	6,25	38,3
1,25	23,3	—	—	—	—

Zooals uit bijgaande tabel IV blijkt, loopt het vereischte minimum, kenbaar aan het practisch gelijk blijven der filtraat-N bij verdere reagens-toevoeging — de toelaatbare analysefout bedraagt ongeveer 1 à 2 % der gevonden getalwaarde — zeer uiteen bij de 3 kaasextracten, afkomstig van verschillende kazen van sterk uiteenloopenden ouderdom.

Bij de practische toepassing zal men, wanneer de W.N. der extracten reeds ongeveer bekend is, er gewoonlijk mee kunnen volstaan, door 2 of 3 analyses met verschillende hoeveelheden phosphorwolframaamzuur uit te maken, of de maximale precipitatie der niet-aminozuur N bereikt is.

Er zijn nog enkele andere omstandigheden, die invloed kunnen hebben op het analyseresultaat, zooals een verhoogde toevoeging van zwavelzuur, waardoor de uitkomst iets lager bleek te worden. Zoo werd na toevoeging van 30 ml zwavelzuur (1 op 4 vol. water) per 100 ml eindvolume voor de afbraak N gevonden 16,7 % der W.N., doch met 40 ml 16,2 %. Bij een ander kaasextract werd aldus 21,9 % en 21,0 % gevonden. Ook het langer dan 24 uren laten staan vóór het affiltreren gaf iets lagere waarden.

Uit dit alles blijkt wel duidelijk, dat de gevonden afbraak-N-cijfers sterk afhankelijk zijn van de gevolgde methode, die bijv. rekening dient te houden met het wisselend N-gehalte der kaasextracten en verder nauwkeurig dient te zijn omschreven. Daar dit niet altijd is geschied, zijn de in de literatuur vermelde cijfers meermalen slechts onder een zeker voorbehoud te aanvaarden en bovendien niet zonder meer vergelijkbaar.

De hier beschreven methode werd bij het geheele onderzoek over de kaasrijping ongewijzigd toegepast om goed vergelijkbare resultaten te verkrijgen.

Bij het nog verder voortgezet onderzoek over deze werkwijze bleek uit eenige oriënteerende analyses, dat het wellicht mogelijk zou zijn, het meergenoemde tekort aan afbraak N, vooral bij oude kazen, te verminderen door de concentratie van de aminozuren in de 50 ml te analyseeren extract te reduceeren door bijv. 50 ml water daaraan toe te voegen en na de precipitatie met phosphorwolframaamzuur, het eindvolume op 200 in plaats van 100 ml te brengen. Het scheen daarbij wenschelijk de hoeveelheid zwavelzuur te verdubbelen om dezelfde concentratie daarvan te behouden. Ook werd, om de nauwkeurigheid niet te schaden, de N-bepaling nu in een dubbele portie filtraat verricht. Op deze wijze werd, uitgaande van eenzelfde hoeveelheid extract en totaal-aminozuur N als vroeger, de hoeveelheid phosphorwolframaat-N der basische aminozuren en van cystine, die nu in het geheele, verdunde filtraat in oplossing kon blijven en aldus tot de afbraak N kon bijdragen, niet onbelangrijk vergroot.

Ofschoon uit het genoemde oriënteerend onderzoek, dat wegens bijzondere omstandigheden niet op grootere schaal kon worden voortgezet, nog geen definitieve conclusie valt te trekken, lijkt het er toch veel op, dat in deze richting nog wel iets meer bereikt zal kunnen worden ter verbetering der afbraak-N-methode, die zooals zooveel andere voor het onderzoek van eiwithhydrolysaten gebruikelijke werkwijzen, nog lang niet als volmaakt is te beschouwen.

b. *De formoltitratiemethode volgens SÖRENSEN.* Deze methode heeft zich met enkele wijzigingen reeds sinds 1907 goed kunnen handhaven en

een uitgebreide toepassing gevonden, ofschoon ook hierbij wel enkele foutenbronnen aanwezig zijn. Zoo is de methode bij een zeer gering gehalte der te onderzoeken oplossing aan aminozuren niet zeer gevoelig en heeft zij het nadeel, dat zij, volgens SÖRENSEN zelf (52), voor tyrosine te hoog en voor proline te lage waarden geeft.

Toch wordt zij nog altijd als een belangrijke methode beschouwd (53), die nauwkeurig en snel uitvoerbaar is (54). HARDING en MAC LEAN (55) vonden, bij vergelijking van hun colorimetrische ninhydrinemethode met de gazometrische werkwijze volgens VAN SLIJKE en met die van SÖRENSEN, een zeer bevredigende overeenstemming der resultaten. Volgens ABDEHBALDEN en KRAMM (56) is de laatste werkwijze te verkiezen boven die van VAN SLIJKE, wanneer de bepalingen in tegenwoordigheid van eiwitten of hoogmoleculaire afbraakproducten daarvan, moeten geschieden. DUNN en LOSHAKOFF (57) pasten de methode SÖRENSEN zelfs toe om de zuiverheid van hun aminozuurpreparaten te bepalen, waarbij zij voor het vaststellen van het titratie-eindpunt de glaselectrode gebruikten.

De formoltitratie, bij een kaasextract toegepast, beoogt niet, zooals de phosphorwolframzuurmethode, de totale N van alle aanwezige aminozuren te bepalen, doch is, o.a. volgens NORTHROP (58) en CALVERY (53), in het bijzonder geschikt, om de voortschrijding van een enzymatische eiwitplitsing, zooals in kaas, na te gaan. Zij stelt ons n.m. in staat, de toename der eindstandige α -aminozuurgroepen en der α -aminozuren te bepalen, welke bij de hydrolytische splitsing der peptiedbindingen van de hoofdzakelijk uit aminozuren opgebouwde eiwitten vrij komen voor de titratie. De bepaling daarvan geschiedt volgens de methode SÖRENSEN (59, 60) aldus, dat — na verwijdering der storende fosfaten en van CO_2 uit de te onderzoeken oplossing en na neutralisatie van het filtraat ten opzichte van lakmoes — de NH_2 -groep van het α -aminozuur door het toegevoegde formaline geblokkeerd wordt als methyleenverbinding, waardoor de bijbehorende COOH -groep vatbaar wordt voor volledige titratie met loog. Deze titratie moet echter tot sterk alkalische reactie worden voortgezet, volgens HARRIS (61) minstens tot een $\text{pH} = 8,7$, volgens HENRIQUES en SÖRENSEN (59) en volgens NORTHROP (58) ongeveer tot een $\text{pH} = 9$, dus tot een sterk roode kleur van phenolphthaleïne. Daar eventueel in de oplossing aanwezige ammoniumzouten, die overigens — mits niet in belangrijke concentratie aanwezig — niet storend werken, bij de titratie kwantitatief mee bepaald worden (59, 62) moet het afzonderlijk vastgestelde ammonium-N-gehalte in mindering gebracht worden van het resultaat volgens SÖRENSEN.

De uitvoering der formoltitratie geschiedde bij de te onderzoeken kaas-extracten op de volgende wijze. Uitgegaan werd van 50 ml extract, afkomstig van 4 g kaas, dat na toevoeging van 1 ml halfprocentige alcoholische phenolphthaleïne-oplossing, van fosfaat en CO_2 werd bevrijd door neutralisatie met verzadigde barietoplossing, gevolgd door toevoeging van nog 5 ml daarvan en bovendien eenige ml's verzadigde BaCl_2 -oplossing; na aanvulling tot 100 ml en omschudden werd 10 à 15 minuten later afgefiltreerd. Daar echter de filtratiesnelheid dikwijls veel te wenschen overliet, werd getracht een beter af te filteren neerslag te verkrijgen,

wat gelukte door vóór de neutralisatie met bariet eerst eenig natrium-phosphaat toe te voegen; 5 ml van een M/5 Na_2HPO_4 2 aq-oplossing bleek daarvoor voldoende te zijn; verder werd dan na het bariet steeds 10 à 12 ml verzadigd BaCl_2 toegevoegd.

Van het heldere filtraat werd 80 ml in een Erlenmeyer-kolf van 300 ml overgebracht en uit een buret zóóveel N/5 HCl toegevoegd, dat de roode kleur juist geheel verdwenen was en daarna nog iets meer HCl, tot een druppel der oplossing, op zwak blauw, niet absorbeërend lakmoespapier gebracht, eenzelfde roodachtige tint te voorschijn riep als een daarnaast geplaatste druppel van een phosphaatbuffer met een pH = 6,8, bestaande uit een mengsel van gelijke deelen M/15 KH_2PO_4 en M/15 Na_2HPO_4 2aq oplossingen.

Het aldus geneutraliseerde filtraat werd gemengd met 40 ml formaline-oplossing, bereid door bij 80 ml formol en 2 ml der phenolphthaleïne-oplossing zooveel N/5 NaOH te voegen, dat een blijvende, uiterst zwak rose tint waarneembaar was. Nu werd met de eigenlijke titratie met N/5 NaOH begonnen en het aantal ml's bepaald, noodig om dezelfde kleursterkte te verkrijgen als van een kort te voren gereed gemaakte „blinde”. Deze werd bereid, door bij ± 85 ml gedestilleerd water, 0,8 ml der phenolphthaleïne-oplossing en 40 ml der geneutraliseerde formaline-oplossing te voegen en dan uit een buret zooveel N/5 NaOH, dat een sterk roode kleur, overeenkomend met een pH van $\pm 9,0$ werd verkregen, waarvoor 0,4 à 0,5 ml noodig was.

Het aantal ml's N/5 NaOH, bij de eigenlijke titratie gebruikt, verminderd met het titer der „blinde”, geeft na vermenigvuldiging met 2,8 het aantal mg aminozuur N + ammonium N aan, dat in 40 ml kaas-extract, afkomstig van 3,2 g kaas, aanwezig was. Behalve in zeer jonge kaas is voor de berekening der aminozuur N volgens SÖRENSEN een ammonium-N-bepaling dus steeds noodzakelijk.

Voor een nauwkeurige vergelijking van de te onderzoeken oplossing met de blinde is het gewenscht, dat de volumina ten slotte practisch gelijk worden gemaakt, waarna de kleurgelijkheid bijv. in 100 ml-colorimeter-buizen kan worden gecontroleerd. Bij colorimetrische gelijkheid bleek de pH der te onderzoeken oplossing steeds 0,2 à 0,3 lager te zijn dan de pH der blinde.

4. *Bepaling der ammoniumstikstof*

Reeds in 1906 pasten WINTERSTEIN en BISSEGER (25) de distillatie bij verminderden druk met MgO toe voor de bepaling der N, die in den vorm van ammoniumzouten in rijpende kaas aanwezig is. Volgens SCHOORL (63) is dit hierom een goede methode, omdat aldus uit organische ammoniakderivaten, zooals aminozuren, aminen en zelfs zuuramiden slechts bij hooge uitzondering en dan nog zeer langzaam, eenig NH_3 wordt vrij gemaakt, hetgeen het geval is bij formamide en ureum.

Volgens OSBORNE e.a. (64) wordt geen der als eiwitsplitsingsproducten bekende aminozuren door MgO ontleed.

Daar het bij ons onderzoek wenschelijk werd geoordeeld, de bepaling der ammonium N in dezelfde vloeistof, n.m. in het extract der kazen, uit

te voeren als waarin de aminozuur N werd bepaald, werd er van afgezien om de ammoniakdestillatie met de gemalen kaas zelf te verrichten, zooals ook wel geschiedt. Echter werd het extract steeds in zoo versoh mogelijken toestand onderzocht, daar gebleken was, dat na eenigen tijd bewaren van het extract, zelfs bij 5° C, de hoeveelheid overdistilleerbare ammoniak spoedig toenam.

De distillatie werd, al naar de te verwachten hoeveelheid NH_3 , met 100 of 200 ml kaasextract en ± 3 g in water verdeeld MgO uitgevoerd bij het vacuum van een goede waterstraalluchtpomp; de temperatuur werd geleidelijk tot 40° C opgevoerd. Het stooten werd voorkomen door regelbaar inleiden van NH_3 -vrije lucht door een fijne capillair en door toevoeging van een weinig parafineolie of een paar druppels gesmolten boter-vet. Teneinde bij het vacuum ongewenscht koken van de vloeistof in den ontvanger te beletten, werd deze in ijs en water geplaatst, terwijl door den koeler een langzame stroom ijskoud water werd geleid. De NH_3 werd in water, waarbij een bekende hoeveelheid (gewoonlijk 10 ml) N/10 zwavelzuur was gevoegd, opgevangen uit een omgebogen verlengstuk van den koeler, dat onder de vloeistof uitmondde. Voor alle zekerheid werd de ontvanger nog verbonden met een waschflesch, van water en eenig N/10 zuur voorzien, die eveneens in het ijs- en watermengsel stond; het andere einde der waschflesch was aan de luchtpomp aangesloten. De distillatie duurde ongeveer 1 uur, waarna de inhoud van ontvanger en waschflesch quantitatief in een kolf werden overgespoeld en, na uitkoken en afkoelen, met N/10 loog en methylood werd terug getitreerd.

HOOFDSTUK II

Bereiding en onderzoek der proefkazen

Nadat eenige malen telkens twee proefkaasjes onder verschillende omstandigheden uit dezelfde melk waren bereid, werd uit diverse mogelijkheden, om daarbij den pH der kazen te beïnvloeden, zooals het gebruik van kaaszursel met verschillend zurend vermogen, de toevoeging van melk-suiker aan de kaasmelk of de vervanging van een deel der wei door water na de eerste bewerking, voor de op grootere schaal te nemen proeven de laatstgenoemde werkwijze gekozen.

Bij de eerste der vier parallelproeven, die op 15 Mei 1941 in de kaas-makerij der Proefzuivelboerderij werd uitgevoerd, waarbij in elk van twee kaasbakken gelijktijdig 190 kg stalmelk werd verkaasd, was het eenige verschil in de bewerking, dat in één der bakken, direct na het snijden en het laten zakken der wrongel, ± 60 l wei werd afgenomen en door evenveel water van dezelfde temperatuur werd vervangen. Overigens werd op een zelfde, normale wijze afgewerkt en er vooral op gelet, dat de 40+ kazen van elken bak zooveel mogelijk een even groot vochtgehalte verkregen.

Op vrijwel dezelfde wijze werd de tweede proef, met weidemelk van 9 September 1941, uitgevoerd; hier werd per 170 kg kaasmelk, na het snijden der wrongel, in één der bakken ± 50 l wei door evenveel water vervangen. Daar de zonder watertoevoeging bereide kazen van deze en de vorige proef al spoedig veel neiging tot kort worden vertoonden, werd bij

de derde parallelproef van 10 December 1941 in den eenen kaasbak 55 l wei door evenveel water en in den anderen bak 5 l wei door 5 l water vervangen. Bij de vierde proef, van 22 April 1942, werd evenzoo gehandeld, behalve dat in plaats van 5 l, nu 10 l wei werd vervangen door 10 l water. Inderdaad werd bij de kazen van deze met weinig water behandelde bakken het gebrek „kort” niet aangetroffen, terwijl de pH's na 3 weken iets boven 5,0 waren gelegen, wat bij de zonder water bereide kazen der eerste twee proeven niet het geval was.

Bij de toepassing der vroeger besproken bereidingsmethode der kaas-extracten op deze twee soorten kaas, waarvan de pH's na 1 week ongeveer 0,3 uiteenliepen, scheen het gewenscht er rekening mede te houden, dat — zooals bij een voorloopig onderzoek was gebleken — de extraheerende waterige vloeistoffen al zeer spoedig eveneens een belangrijk verschillende pH aannemen, zoodat de extracties dan feitelijk niet onder gelijke omstandigheden geschieden. Om dit te voorkomen, werd, door toevoeging van een kleine, experimenteel van te voren bepaalde, hoeveelheid N/10 HCl bij het extractiewater der minst zure kaas, er voor gezorgd, dat het genoemde pH-verschil der vloeistoffen in elk geval sterk werd gereduceerd.

Ten einde na te kunnen gaan, of het al of niet gelijk maken der pH's bij het extraheeren inderdaad van invloed was op de cijfers der eiwit-splitsingsproducten, werden voorloopig bij elk der minst zure kazen de extracties zonder en met HCl-toevoeging uitgevoerd, tegelijk met de extractie met water der zuurdere kazen. Zooals blijken zal, werd er inderdaad meermalen een, hoewel meestal gering verschil in de bedoelde cijfers verkregen. Voor zoover bij het latere onderzoek deze extractie slechts op één wijze plaats had, werd de meest juist geachte methode, dus onder toevoeging van het voor pH-gelijkmaking vereischte HCl, toegepast. Steeds werden dan ook de analysecijfers der aldus bereide, met het cijfer 2 aangeduide, extracten gebruikt voor een vergelijking met de cijfers, die in de extracten der zuurdere kazen waren bepaald.

In tabel V, betrekking hebbend op de kazen AB en WX der eerste parallelproef, zijn na 7 verschillende rijpingstijden, opklimmend van 3 weken tot 11 maanden, behalve de pH's der kazen en der extracten ook de vocht- en totaal-stikstofgehalten der kazen weergegeven. Gedurende de geheele proef is een pH-verschil in de kazen blijven bestaan van 0,3 à 0,4, terwijl de pH's zelf langzamerhand niet onbelangrijk zijn toegenomen, meer dan gewoonlijk het geval is. De pH's der *extracten* AB₂ der minst zure kazen, waarbij zoutzuurtoevoeging is toegepast (in tegenstelling met de extracten AB₁), vertoonen nog wel eenig verschil met de pH's der extracten WX, doch dit is gering in vergelijking met het verschil, tusschen de pH's der extracten AB₁ en WX gevonden.

In het vocht- en het totaal-N-gehalte der AB- en WX-kazen zijn telkens zulke geringe verschillen aanwezig, dat hieraan geen storende invloed van eenig belang op de eiwitplitsing is te verwachten. Ook bij de andere proeven is dit het geval gebleken. Volledigheidshalve zij hier nog vermeld — hetgeen niet in tabel V is opgenomen —, dat 1 week na de bereiding der kazen voor de pH's van AB en WX resp. 5,24 en 4,95,

voor het vocht 46,9 % en 46,8 % en voor de totaal N 3,91 % en 3,90 % was gevonden.

Gaan we in de tabel V verder na, wat de invloed is geweest van de door HCl bewerkte verlaging der pH's bij de extractie der AB-kazen, dan zien we uit de telkens onder AB₁ en AB₂ vermelde cijfers, dat de hierdoor veroorzaakte verschillen in de W.N., de aminozuur N, de afbraak N en de ammonium N, uitgedrukt in % der T.N., doorgaans van zeer weinig beteekenis waren. Alleen voor de max. coaguleerbare N werden in de extracten, onder HCl-toevoeging bereid, iets lagere waarden gevonden dan in de met water alleen verkregen extracten. Hetzelfde geldt voor de gevonden cijfers in de extracten AC₁ en AC₂, resp. AD₁ en AD₂ der tabellen VI en VII, behalve voor de max. coag. N van AD₁ en AD₂, waarbij geen verschil merkbaar was.

De belangrijkste waarden, d.w.z. die, welke zijn uitgedrukt in % van de T.N. en — wat de minst zure kazen betreft — waren verkregen bij onderzoek der extracten, onder gelijkmaking der pH's bereid, zijn in de tabellen met vetgedrukte cijfers weergegeven.

Bij vergelijking der voor de extracten AB₂ en WX verkregen waarden voor de W.N. blijken deze voor AB₂ steeds grooter te zijn dan voor WX, wat vooral na de eerste drie rijpingstijden duidelijk uitkomt.

Ook de procentsgewijs op de totale-kaas-N berekende hoeveelheden, die als aminozuur-, afbraak- en ammonium N in de extracten werden aangetroffen, waren bijna zonder uitzondering hooger bij de minder zure kazen AB, waar dus deze vergevorderde eiwitsplitsing over het algemeen op hetzelfde tijdstip der rijping grootere afmetingen had aangenomen dan in de zuurdere WX-kazen. Daarentegen waren de N-waarden der hier slechts in geringe hoeveelheden aanwezige oplosbare eiwitten en eiwitachtige splitsingsproducten voor de AB-kazen, althans van 3½ maand en ouder, lager dan van de WX-kazen, zooals blijkt uit de in de extracten AB₂ en WX voor de max. coaguleerbare N gevonden cijfers. Dit wordt verklaarbaar, wanneer we aannemen, dat de dieper gaande splitsing in aminozuren en ammoniumverbindingen bij de AB-kazen gedeeltelijk ten koste van een snellere afbraak der reeds aanwezige oplosbare eiwitachtige stoffen is geschied dan bij de WX-kazen.

Over de hoeveelheden, waarin de belangrijke middengroep der eiwitsplitsingsproducten, welke gewoonlijk als de groep der albumosen en peptonen wordt aangeduid, in de extracten voorkomt, zullen we ons slechts bij benadering op de hoogte kunnen stellen en wel door gebruik te maken van de voor de andere groepen verkregen analysecijfers, daar een algemeen als juist erkende directe analyse-methode hiervoor nog niet bestaat. De N-cijfers, die men verkrijgt, wanneer de W.N. met de som van de max. coag. N, de aminozuur N en de ammonium N wordt vermindert, geeft ongeveer het gehalte aan albumose- en pepton N weer; de cijfers daarvan zijn eveneens in de tabellen V t/m VIII opgenomen. Waar, zooals in de extracten van AB en WX, die na 3 weken waren verkregen, geen ammonium N van eenige beteekenis werd verwacht, is de bepaling daarvan achterwege gebleven. Voor de in rekening te brengen aminozuur N is de afbraak N gekozen, niettegenstaande de vroeger ver-

melde zwakke zijde dier methode, daar in elk geval de zekerheid bestaat, dat in die afbraak N, zooals deze bij dit onderzoek is bepaald, geen albumose- of pepton N is inbegrepen, wat bij de methode SÖRENSEN waarschijnlijk wel eenigermate het geval is.

Volgens de cijfers der tabel V zijn de aldus berekende albumose-pepton N-waarden, uitgedrukt in procenten van de T.N. der kaas, na 3 en 8 weken en na $3\frac{1}{2}$ maand belangrijk hooger voor de AB-kazen dan voor de zuurdere WX-kazen; na langere rijpingstijden is het verschil veel kleiner geworden.

De invloed van den rijpingsduur op de N-cijfers van deze groep is voor beide soorten kaas veel geringer dan op die der aminozuur- en ammoniumberivaten; eerstgenoemde cijfers wisselen na de verschillende rijpingstijden van AB₂ slechts van 24,3 tot 27,3 % en voor WX van 19,5 tot 24,8 % der T.N.

Naast deze beschouwingen over de procentische hoeveelheden der totale kaas-N, die voor de verschillende groepen splitsingsproducten werden aangetroffen, kunnen we ook de vraag stellen, welk gedeelte der totale hoeveelheid W.N. in elk dier groepen voorkomt en welke verschillen in dit opzicht voor de extracten AB₂ en WX zijn te constateeren. Wanneer we daarvoor de in procenten der W.N. uitgedrukte cijfers raadplegen, dan blijkt, met slechts een enkele uitzondering, dat de aminozuur N, volgens SÖRENSEN bepaald, de ammonium N, en ook — hoewel in mindere mate — de zeer groote bedragen aan albumose-pepton N, sterker vertegenwoordigd zijn in de AB₂- dan in de WX-extracten. Voor de aminozuur N, volgens de phosphorwolframzuurmethode bepaald, werden daarentegen voor AB₂ na 3 en 8 weken en $3\frac{1}{2}$ maand iets lagere waarden gevonden dan voor WX, terwijl er na $5\frac{1}{2}$ en $8\frac{1}{2}$ maand geen verschil bestond; eerst na 11 maanden was de afbraak N voor AB duidelijk hooger dan voor WX, n.m. resp. 30,8 en 29,0 % van de W.N.

Wat het geringe aandeel der max. coag. N in de W.N. betreft, dit blijkt steeds het kleinst te zijn bij de extracten der minder zure kazen.

De in tabel VI verzamelde analyseresultaten, verkregen bij de kaas-extracten der 2e parallelproef, gaven in vele opzichten eenzelfde beeld als de cijfers van tabel V. Ook hier waren de gevormde hoeveelheden voor de W.N., de aminozuur N volgens SÖRENSEN, de afbraak N, de ammonium N en de albumose-pepton-N, uitgedrukt in procenten van de T.N. der kaas, doorgaans hooger voor de extracten der minder zure kazen AC dan voor de YZ-kazen. De verschillen waren nu echter voor de aminozuur- en afbraak N na 1 week en 3 weken nog van weinig of geen beteekenis, wel na de langere rijpingstijden.

Voor beide kazen AC en YZ waren de N-waarden der diverse groepen ontledingsproducten, uitgezonderd de max. coaguleerbare N, aanzienlijk lager dan die, welke voor de eerste proefkazen na de overeenkomstige rijpingstijden waren gevonden.

Laatstbedoelde kazen, AB en WX, vertoonden dan ook reeds vroeg en nog vóór de latere sterke pH-stijging, een abnormaal snelle chemische rijping, waarvan de oorzaak niet geheel duidelijk is geworden, ofschoon de hoogere rijpingstemperaturen er wel een rol bij gespeeld zullen hebben. Het ontstaan van zooveel melkzuurbindende splitsingsproducten, vooral

TABEL VI. 40+ Kazen AC en YZ, gemaakt 9 September 1941.

Ouderdom der kazen	1 week			3 weken			3 maanden			5 maanden			7 maanden			10 maanden		
	AC	YZ	AC ₂	AC	YZ	AC ₂	AC	YZ	AC ₂	AC	YZ	AC ₂	AC	YZ	AC ₂	AC	YZ	AC ₂
Kaas gemerkt	5,19	4,90	5,28	4,97	5,30	4,95	5,44	4,95	5,44	4,95	5,44	4,95	5,44	5,14	5,55	5,26		
pH der kaas	47,5	48,1	46,0	46,1	41,1	39,2	38,7	39,2	38,7	39,2	38,7	39,2	38,7	37,1	37,6	37,4	35,0	
Vochtelhalte der kaas in %																		
Totaal-N-gehalte der kaas in %	3,92	3,80	3,98	3,96	4,37	4,47	4,56	4,47	4,56	4,47	4,56	4,47	4,56	4,65	4,67	4,68	4,85	4,92
(T. N.)																		
Kaasextracten	AC ₁	YZ	AC ₂	AC ₁	YZ	AC ₂	AC ₁	YZ	AC ₂	AC ₁	YZ	AC ₂	AC ₁	YZ	AC ₂	AC ₁	YZ	AC ₂
pH der kaasextracten	5,81	5,39	5,40	5,75	5,35	5,40	5,83	5,42	5,45	—	5,59	5,65	—	5,55	5,57	—	5,52	5,66
Wateroplosbare N (W. N.) in %	19,3	18,1	18,0	23,9	22,3	20,1	33,0	31,6	25,7	35,4	31,6	35,9	31,6	35,9	31,6	41,3	36,2	
Maximaal coaguleerbare N in %	34,5	31,4	30,9	30,8	26,2	25,9	21,1	17,0	20,9	15,6	21,5	11,6	16,5	11,6	16,5	9,5	13,3	
Maximaal coaguleerbare N in %	6,7	5,7	5,6	7,4	5,8	5,2	7,0	5,4	5,4	5,5	6,8	4,2	5,2	4,2	5,2	3,9	4,8	
Aminozaur N volgens SÖRENSEN	12,0	11,6	10,6	15,1	16,8	17,3	23,8	25,2	25,1	23,6	20,1	33,5	32,1	33,5	32,1	38,0	35,9	
in % der W. N.	2,3	2,1	1,9	3,6	3,7	3,5	7,9	8,0	6,5	8,4	6,3	12,1	10,0	12,1	10,0	15,7	13,0	
Aminozaur N volgens SÖRENSEN	13,6	13,2	12,8	15,5	15,6	17,5	22,1	22,3	24,3	25,0	24,5	29,7	30,8	29,7	30,8	33,3	34,7	
in % der T. N.	2,6	2,4	2,3	3,7	3,5	3,5	7,3	7,0	6,2	8,9	7,7	10,7	9,6	10,7	9,6	13,8	12,6	
Afbraak N (phosph. wolfr. z.-meth.)	—	—	—	—	—	—	3,4	3,6	3,0	4,1	4,5	5,1	4,8	5,1	4,8	6,4	7,2	
in % der W. N.	—	—	—	—	—	—	1,1	1,1	0,8	1,5	1,4	1,8	1,5	1,8	1,5	2,7	2,6	
Afbraak N (phosph. wolfr. z.-meth.)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
in % der T. N.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Ammonium N (bepaald als NH ₃)	51,9	55,4	56,3	53,7	58,2	56,6	53,4	57,1	51,8	55,3	49,5	53,6	47,9	53,6	47,9	50,8	44,8	
in % der W. N.	10,0	10,0	10,1	12,8	13,0	11,4	17,6	18,1	13,3	19,5	15,7	19,2	15,0	19,2	15,0	20,9	16,2	
Albumose- en pepton-N (berekend) in % der W. N.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Albumose- en pepton-N (berekend) in % der T. N.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Albumose- en pepton-N + max. coag. N in % der T. N.	15,7	15,7	15,7	18,8	18,6	18,6	23,5	23,5	18,7	25,0	22,5	23,4	20,2	23,4	20,2	24,8	21,0	

in de AB-kazen, waardoor de concentratie van het grootendeels ongeïoniseerde melkzuur een sterke afname ondergaat, kan tenslotte voor de ontwikkeling van ongewenste eiwitsplitsende bacteriën, waarmede de kaasmelk vermoedelijk meer dan normaal besmet was, bevorderlijk zijn geweest. Door dit verdwijnen van ongesplitste melkzuurmoleculen toch, vervalt ook de remmende invloed, die zij op den groei van zulke bacteriën vermogen uit te oefenen, hetgeen in 1937 door HOSTETTLER en ZOLLIKOFER (65) o.a. voor *Bac. putrificus* is aangetoond, terwijl het onderzoek van VAN DAM (66) in 1918 een aanwijzing gaf, dat de groeibelemmering van colibacteriën bij aanwezigheid van melkzuur waarschijnlijk meer aan de ongesplitste melkzuurmoleculen dan aan H^+ -ionen moest worden toegeschreven. In meer algemeenen zin hebben KOLTHOFF (67), BACH (68) en verschillende door ROGERS' Associates (69) genoemde onderzoekers gewezen op de beteekenis der belemmerende werking op den bacteriëngroei, die behalve aan de H^+ -ionen, en soms meer dan aan deze, toekomt aan het ongedissocieerde deel der organische zuren, die reeds in het desbetreffende milieu aanwezig waren of zich bij de bacteriëntwikkeling hebben gevormd.

Bij de 2e parallelproef waren de hoeveelheden max. coag. N belangrijker dan bij de vorige; zij bewogen zich voor AC en YZ van 5,7, resp. 5,6 % na 1 week tot 3,9, resp. 4,8 % der T.N. na 10 maanden. Na 1 week en na 3 weken was het N-gehalte van deze groep oplosbare eiwitten en eiwitachtige stoffen eerst iets grooter voor AC dan voor YZ, na 3 maanden voor beide gelijk en later voor AC het kleinst. Dit kan een gevolg zijn van voor AC en YZ ongelijke veranderingen in de vormings- en ontledingssnelheden der oplosbare eiwitachtige stoffen van deze groep. Hoewel, gezien de daling der max. coag. N-cijfers over de geheele rijpingsperiode, voor AC zoowel als voor YZ, de ontledingssnelheid dezer tusschenproducten op den duur blijkbaar de vormingssnelheid overtreft, kan dit verschil voor AC en YZ ongelijke afmetingen aannemen. Zoo zou in de eerste weken der kaasrijping, wanneer de splitsing der oorspronkelijke kaaseiwitten nog een groote rol speelt, een snellere ontleding daarvan in de minder zure kazen AC een verhoogde vormingssnelheid der oplosbare eiwitachtige stoffen van AC ten opzichte van die der YZ-kazen tot gevolg kunnen hebben, waardoor de max. coag. N voor AC tijdelijk hoger zou worden dan voor YZ, zooals na 3 weken het geval was, n.m. 5,8 % tegen 5,2 % der T.N. bij YZ. De lagere waarde der max coag. N voor AC dan voor YZ, na 5 maanden gevonden, zou verklaarbaar zijn door aan te nemen, dat in de latere periode, toen de splitsing der oorspronkelijke kaaseiwitten niet zóó belangrijk meer was als aanvankelijk, de ontledingssnelheid der oplosbare eiwitachtige stoffen nu meer op den voorgrond trad en tevens bij AC grootere afmetingen had aangenomen dan bij YZ, waardoor de max. coag. N 5,5 % werd, tegen 6,8 % voor YZ.

Wanneer we bij deze proef ten slotte ook nog eens nagaan, welk aandeel de N van elk der groepen kaasrijpingsproducten heeft gehad in de geheele hoeveelheid W.N., dan geldt, op één uitzondering in den aanvang der rijping na, dat de aminozuur N volgens SÖRENSEN der AC-kazen, alsook de albumose-pepton-N, in grooter percentage in de W.N. vertegenwoordigd

waren dan met deze N-waarden der YZ-kazen het geval was; voor de afbraak N kon dit slechts na 1 week en 5 maanden geconstateerd worden en voor de ammonium N in 2 van de 4 onderzochte gevallen, zoodat hier bij deze laatste groepen in dit opzicht geen regelmaat heerschte. Evenals bij de vorige proef heeft, althans na 3 maanden en langer, de max. coag. N der AC-kazen in mindere mate dan die der zuurdere YZ-kazen tot de W.N. bijgedragen.

De pH's der kazen AC en YZ waren na 3 weken resp. 5,28 en 4,97 en dus vrijwel gelijk aan die der overeenkomstige kazen der eerste proef; de totale stijging, n.m. tot 5,55 en 5,26 na 10 maanden, was echter veel geringer.

De bij het onderzoek der 3e dubbele reeks proefkazen verkregen analysecijfers zijn verzameld in tabel VII. Ook bij deze proefkazen bleken de gevonden waarden voor de W.N. en de N der verschillende groepen omzettingsproducten (behalve voor de max. coag. N), uitgedrukt in procenten der T.N. der kaas, bij de minder zure kazen AD hooger te zijn dan bij de zuurdere WX'-kazen, doch in afwijking van hetgeen bij de vorige 2 proeven het geval was, begonnen deze verschillen eerst na 7 weken duidelijk merkbaar te worden. Ook waren zij in vele gevallen geringer dan vroeger; vooral bij de albumose- en pepton N waren die verschillen meestal van weinig beteekenis en niet steeds in dezelfde richting gelegen. De vrij belangrijke hoeveelheid max. coag. N vertoonde weer, en nu voor de geheele rijpingsperiode, het bekende beeld; zij was telkens iets lager voor de minder zure kazen dan voor de kazen WX'; de verschillen waren hier zeer gering.

Wat verder de verdeling aangaat der hoeveelheden N van de verschillende groepen over de totale hoeveelheid W.N.: na de rijpingstijden van 7 weken en langer droegen niet alleen de aminozuur N, zooals bij de vorige proef, maar ook de afbraak N en de ammonium N der AD-kazen verder zonder uitzondering in sterkere mate dan die N-waarden der WX'-kazen bij tot de totale hoeveelheid W.N., terwijl voor de max. coag. N weer juist het tegenovergestelde het geval was. Voor de albumose-pepton N waren de verschillen in dit opzicht, uitgezonderd na 7 maanden, zeer gering, het groote percentage der W.N. (55 à 60 %) in aanmerking genomen, dat deze groep voor zich opeischt.

De pH's van AD en WX' waren na 1 week \pm 0,2 hooger dan bij de vorige proeven; de stijging na 7 maanden was nog geringer dan bij AC en YZ.

De resultaten van het chemisch onderzoek der kazen HK en F van het 4e paar proefbakken, medegedeeld in tabel VIII, waren over het algemeen zóó gelijkwaardig aan die van de vorige proef, dat kan worden volstaan met slechts op enkele punten de aandacht te vestigen.

Terwijl ook hier de minst zure kazen HK, behalve na de eerste weken, duidelijk hogere cijfers voor de W.N., de aminozuur-, de afbraak- en de ammonium N vertoonden dan de F-kazen, was de W.N. van beide kazen, waarschijnlijk door de hogere rijpingstemperaturen, na 4 en 5 maanden belangrijk hooger dan van de overeenkomstige kazen AD en WX' der

TABEL VII. 40 + Kazen AD en WX', gemaakt 10 December 1941.

Ouderdom der kazen	1 week		4 weken		7 weken		4 maanden		5 maanden		7 maanden	
	AD	WX'	AD	WX'	AD	WX'	AD	WX'	AD	WX'	AD	WX'
Kaas gernerkt												
pH der kaas	6,35	5,07	5,38	5,07	5,45	5,14	5,47	5,13	5,45	5,10	5,47	5,17
Vochtgehalte der kaas in %	44,9	45,0	41,9	42,8	40,5	40,0	36,9	37,1	36,0	36,8	35,4	35,4
Totaal-N-gehalte der kaas in % (T. N.)	4,10	4,06	4,32	4,15	4,43	4,39	4,65	4,61	4,77	4,62	4,73	4,74
Kassextracten	AD ₁	AD ₂	AD ₁	AD ₂	AD ₁	AD ₂	AD ₁	AD ₂	AD ₁	AD ₂	AD ₁	AD ₂
pH der kaasextracten	6,01	5,60	5,59	5,57	5,60	5,52	5,57	5,58	5,52	5,54	—	5,57
Wateroplosbare N (W. N.) in % . .	12,7	13,1	18,6	18,2	18,4	20,8	20,3	19,7	25,5	26,0	25,1	32,8
Maximaal coaguleerbare N in % . .	30,4	30,6	30,3	26,7	26,1	27,2	—	22,3	23,7	16,1	15,8	17,0
Maximaal coaguleerbare N in % der T. N.	3,9	4,0	4,1	4,8	4,8	5,0	—	4,5	4,7	4,1	4,1	4,3
Aminozuur N volgens SÖRENSEN in % der W. N.	15,9	14,1	14,5	17,1	16,8	18,4	20,5	20,4	16,7	25,2	25,0	21,9
Aminozuur N volgens SÖRENSEN in % der T. N.	2,0	1,8	2,0	3,1	3,1	3,4	4,3	4,1	3,3	6,4	6,5	5,5
Atbraak-N (phosph.wolfr.z.-meth.) in % der W. N.	15,3	13,7	13,7	17,1	16,6	16,4	17,5	17,7	17,5	21,8	21,7	21,4
Atbraak-N (phosph.wolfr.z.-meth.) in % der T. N.	1,9	1,8	1,9	3,1	3,0	3,0	3,6	3,6	3,4	5,6	5,6	5,4
Ammonium N (bepaald als NH ₃) in % der W. N.	1,7	1,0	1,2	2,3	1,8	1,1	1,7	1,6	1,0	2,9	2,6	1,7
Ammonium N (bepaald als NH ₃) in % der T. N.	0,2	0,1	0,2	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,7	0,7	0,4
Albumose- en pepton-N (be- rekend) in % der W. N.	62,6	54,7	54,8	53,9	55,5	55,3	—	58,4	57,8	59,2	59,9	59,9
Albumose- en pepton-N (be- rekend) in % der T. N.	6,7	7,2	7,4	9,8	10,1	10,2	—	11,9	11,4	15,1	15,6	15,0
Albumose- en pepton-N + max. coag. N in % der T. N.	11,2	11,5	14,9	15,2	16,4	16,1	—	19,7	19,3	20,9	21,1	21,5
												22,8

TABEL VIII. 40 + Kazen HK en F, gemaakt 22 April 1942.

Ouderdom der kazen	1 week		3 weken		6 weken		10 weken		3 maanden		4 maanden		5 maanden	
	HK	F	HK	F	HK	F	HK	F	HK	F	HK	F	HK	F
Kaas gemerkt	5,28	4,98	5,33	5,03	5,32	5,01	5,34	5,03	5,40	5,10	5,52	5,28	5,56	5,32
pH der kaas	45,9	46,0	43,6	42,5	42,9	42,1	42,0	41,0	41,4	41,4	40,4	39,6	39,6	39,5
Vochtgehalte der kaas in %	3,92	3,85	4,04	4,03	4,02	4,02	4,10	4,09	4,17	4,14	4,26	4,25	4,29	4,28
Totaal-N gehalte der kaas in % (T.N.)	HK ₂	F	HK ₂	F	HK ₂	F	HK ₂	F	HK ₂	F	HK ₂	F	HK ₂	F
Kaasextracten	5,56	5,58	5,56	5,58	5,43	5,45	5,44	5,49	5,48	5,50	5,58	5,60	5,57	5,62
pH der kaasextracten	12,5	13,5	14,8	15,0	20,0	19,7	24,7	23,7	28,4	27,6	32,5	31,3	36,1	35,7
Wateroplosbare N (W.N.) in % der T.N.	28,3	30,0	24,6	25,6	19,8	22,1	15,4	16,5	12,1	14,1	9,1	9,6	7,4	8,8
Maximaal coaguleerbare N in % der W.N.	3,5	4,0	3,6	3,8	4,0	4,4	3,8	3,9	3,4	3,9	3,0	3,0	2,7	3,1
Maximaal coaguleerbare N in % der T.N.	11,5	11,7	16,4	16,2	19,6	18,1	24,2	24,0	29,9	27,9	36,6	33,1	39,8	35,8
Aminozuur N volgens SÖRENSSEN in % der W.N.	1,4	1,6	2,4	2,4	3,9	3,6	6,0	5,7	8,5	7,7	11,9	10,4	14,4	12,8
Aminozuur N volgens SÖRENSSEN in % der T.N.	14,0	13,9	19,3	17,4	21,3	21,1	24,3	24,4	28,3	27,5	34,2	32,5	35,3	33,3
Afbraak N (phosph.wolfr.z.-meth.) in % der W.N.	1,8	1,9	2,9	2,6	4,3	4,2	6,0	5,8	8,0	7,6	11,1	10,2	12,7	11,9
Afbraak N (phosph.wolfr.z.-meth.) in % der T.N.	1,7	1,1	1,9	1,2	1,8	1,1	3,0	1,9	4,4	3,0	6,1	4,7	7,2	5,7
Ammonium N (bepaald als NH ₃) in % der W.N.	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2	0,7	0,5	1,2	0,8	2,0	1,5	2,6	2,0
Ammonium N (bepaald als NH ₃) in % der T.N.	56,0	55,0	54,2	55,8	57,1	55,7	57,3	57,2	55,2	55,4	50,6	53,2	50,1	52,2
Albumose- en pepton-N (berekend) in % der W.N.	7,0	7,4	8,0	8,4	11,3	10,9	14,2	13,5	15,8	15,3	16,4	16,6	18,1	18,7
Albumose- en pepton-N (berekend) in % der T.N.	10,5	11,4	11,6	12,2	15,3	15,3	18,0	17,4	19,2	19,2	19,4	19,6	20,8	21,8
Albumose- en pepton-N + max. coag. N in % der T.N.														

vorige proef, waartoe de aminozuur- en ammonium N veel hebben bijgedragen. De albumose-pepton-N van HK en F na 4 en 5 maanden was slechts weinig hooger, de max. coag. N zelfs lager dan bij de overeenkomstige kazen der 3e proef.

De pH's van HK en F waren na 1 week $\pm 0,1$ lager dan van AD en WX; de toename na 5 maanden was echter iets grooter.

In het kort kunnen we de genoemde verschillen, die tusschen de minder zure en de zuurdere kazen van elk der 4 parallelproeven bleken te bestaan, als volgt samenvatten.

1°. *Bij beschouwing der N-cijfers, uitgedrukt in % der T.N. der kaas:*

De W.N., de aminozuur- en de afbraak N waren, op één uitzondering na, bij de 1e en de 2e parallelproef reeds na 3 weken (resp. 1 week), bij de 3e en 4e proef na 7 (resp. 6) weken en verder na alle langere rijpingstijden steeds hooger voor de minder zure kazen dan voor de zuurdere. De verschillen waren bij de eerste 2 proeven meestal niet onbelangrijk grooter.

De ammonium N was bij alle proeven na de korte rijpingstijden nog van weinig beteekenis; na de langere tijden werden voor de minder zure kazen steeds de hoogste waarden gevonden.

De albumose- en pepton N der eerste 2 proeven vertoonden in dit opzicht vrijwel hetzelfde beeld als de W.N.; bij de 3e en 4e proef werden slechts na matige rijpingstijden (6 weken tot 3 à 4 maanden) eveneens voor de minder zure kazen iets hogere waarden gevonden; na de andere tijden waren de cijfers of practisch gelijk of iets lager voor de minder zure kazen.

De hoeveelheid max. coag. N was, in tegenstelling met de vorige groepen, dikwijls juist geringer bij de minder zure kazen; voor de eerste 2 proeven geldt dit echter eerst na $3\frac{1}{2}$ maand, resp. 5 maanden; bij de laatste proeven was het na alle onderzochte rijpingstijden het geval; de verschillen waren hier meestal gering.

2°. *Bij beschouwing der N-cijfers, uitgedrukt in % van de W.N. der kaas:*

De bijdragen der aminozuur N volgens SÖRENSEN en der albumose-pepton-N tot de W.N. waren bij de eerste 2 parallelproeven bijna steeds het hoogste voor de minder zure kazen; voor zoover de aminozuur N aangaat, geldt dit ook van de 3e en 4e proef, doch hier waren de verschillen in albumose-pepton-N zeer gering en wezen niet in een bepaalde richting.

De afbraak N was bij de 1e en 2e proef soms lager, soms hooger voor de minder zure kazen, maar bij de laatste 2 proeven was het aandeel der afbraak N in de W.N. ook weer doorgaans hooger voor de kazen met de hogere pH's.

Waar de hoeveelheden ammonium N eenigszins belangrijk waren, hadden de kazen met hooger pH het hoogste N-cijfer, uitgezonderd bij de 2e proef, waar dit slechts na 2 van de 4 onderzochte rijpingstijden het geval was.

De max. coaguleerbare N der minder zure kazen droeg daarentegen voor een kleiner deel bij tot de W.N. dan de max. coag. N der kazen met lageren pH, uitgezonderd na de eerste weken bij de 2e en na 1 week

bij de 3e proef; de verschillen waren in deze laatste gevallen echter van weinig beteekenis.

Het belangrijkste resultaat van het voorgaande betreffende de chemische rijping is wel, dat bij elk der parallelproeven, na een korte voorperiode van hoogstens 4 weken, de telkens na een der langere rijpingstijden gevormde hoeveelheden W.N., aminozuur-, afbraak- en ammonium N, uitgedrukt in % der totaal N der kaas, grooter bleken te zijn voor de minder zure dan voor de zuurdere kazen.

Dit wijst op een snellere chemische rijping der kazen met hooger pH dan van die met lageren, vooral in dien zin, dat de snellere vorming van aminozuren en ammoniumderivaten waarschijnlijk een gevolg is van een in die minder zure kazen intensievere, door bacteriëenzymen veroorzaakte ontleding der reeds eerder uit de wrongeleiwitten door het lebferment gevormde eerste splitsingsproducten, n.m. de oplosbare eiwitachtige stoffen en de belangrijke groep der albumosen en peptonen.

Dat o.a. bij de normale Edammerkaasrijping de vorming dezer splitsingsproducten hoofdzakelijk aan de verteerende werking van het lebferment, de verdere afbraak tot eindproducten, als aminozuren en ammoniumderivaten, bijna uitsluitend aan de bacteriëenzymen moet worden toegeschreven, is door de onderzoekingen van VAN DAM (70), VAN SLIJKE (71), ORLA JENSEN (72) e.a. wel zeer waarschijnlijk geworden, al wordt een belangrijke verteerende werking der leb door sommigen ook betwijfeld, zooals door BARTHEL en SANDBERG (73) en door SCHWARZ (74), terwijl VRONK (75) van meening is, dat in Emmenthaler kaas, waar het lebzym niet is kunnen aangetoond worden, daar het bij de hooge bereidingstemperatuur onwerkzaam zou zijn geworden en in Limburger kaas, waar dit door de alkalische reactie der kaas zou geschieden, de rijping bijna geheel aan de proteolytische enzymen der melkzuurbacteriën ware toe te schrijven.

De hoeveelheid der maximaal coaguleerbare N ondergaat volgens de verkregen cijfers na het eerste rijpingsstadium over het geheel genomen een vermindering; de splitsing der bestanddeelen dezer groep speelt hierbij blijkbaar een grootere rol dan de nieuwe vorming daarvan, welke laatste trouwens alleen voor een deel der bestanddeelen, de eiwitachtige eerste splitsingsproducten, te verwachten is. Waar nu de gevonden hoeveelheid max. coag. N in verreweg de meeste gevallen bij de minder zure kazen het kleinst is, wordt het waarschijnlijk, dat een intensievere afbraak der eiwitachtige stoffen tot albumosen en peptonen hiervan de oorzaak is, zoodat men op grond van het gedrag der eerste splitsingsproducten der wrongeleiwitten, ook hier kan spreken van een snellere chemische rijping der minder zure dan der zuurdere kazen bij elke parallelproef.

Ten slotte valt over de belangrijke groep der albumosen en peptonen nog het volgende op te merken. Volgens de genoemde onderzoekingen van VAN DAM kan het verminderen der aanvankelijk groote snelheid, waarmede de W.N. in de rijpende Edammer kaas toeneemt, verklaard worden, doordat de, tengevolge der lebwerking krachtig inzettende ontleding der wrongeleiwitten, langzamerhand meer en meer wordt vertraagd door den remmenden invloed der toenemende hoeveelheid ontledingsproducten, in hoofdzaak albumosen en peptonen, en daardoor tot een toestand van be-

wegelijk evenwicht begint te naderen. Een werkelijk evenwicht treedt niet in, daar met de toenemende vorming der reactieproducten een deel daarvan verder wordt afgebroken door de bacteriënenzymen, waardoor een nieuwe vorming van albumosen en peptonen wordt bevorderd.

Voor dergelijke eerste ontledingsproducten, die met phosphorwolfram-zuur precipiteerbaar zijn, was daarom volgens VAN DAM een vrij constante N-waarde te verwachten, hetgeen door enkele voorloopige proeven, voor niet te oude kaas althans, scheen te worden bevestigd. Ook VAN SLIJKE en HART (76) hadden het, na een aanvankelijk sterke stijging, gedurende een groot deel van den rijpingstijd nagenoeg constant blijven der N van de groep „ps-nucleïne, albumosen en peptonen” opgemerkt, toen zij Cheddar kazen, uit dezelfde melk gemaakt, na verschillende tijden onderzochten. Zij gaven daarvan een eenigszins andere verklaring en kenden een belangrijke remmenden invloed toe aan de gevormde aminozuren en ammoniumderivaten op de vorming der eerstgenoemde wateroplosbare-N-verbindingen bij toenemenden rijpingsgraad, terwijl VAN DAM het ontstaan der aminozuren uit de peptonen juist als een noodzakelijke voorwaarde beschouwde voor een voortgezette ontleding der kaasstof in oplosbare producten.

Wanneer we nu deze ervaringen vergelijken met de bij ons kaasrijpingsonderzoek verkregen gecombineerde, in % der T.N. uitgedrukte, cijfers voor de albumose-pepton-N en voor de max. coag. N, welke onderaan in de tabellen zijn aangegeven, dan zien we het volgende. Na een eerste, aanvankelijk vrij snelle, stijging dier cijfers, zoowel voor de minder zure als voor de zuurdere kazen tot ongeveer 28 % resp. 25 % bij de eerste parallelproef, 24 % resp. 23 % bij de tweede, 20 % resp. 19 % bij de derde en 18 % resp. 19 % bij de vierde proef, treedt er inderdaad bij elke serie kazen, uit denzelfden bak afkomstig, geen belangrijke verandering meer op; hoogstens een geringe stijging, behalve bij de buitengewoon snel gerijpte kazen AB en WX der eerste proef, waar na 8½ maand, resp. 11 maanden, een matige daling merkbaar wordt.

Deze groep onderscheidt zich dus duidelijk van die der aminozuren en ammoniumderivaten; van welke, ook na de langere rijpingstijden, de gevonden bedragen N met een belangrijk percentage daarvan bleven toemen. Overigens blijkt uit de verschillende waarden voor bovengenoemde maxima gevonden, dat deze afhankelijk zijn van de omstandigheden, waaronder de kaas werd gemaakt, zooals ook reeds door VAN SLIJKE en HART (l.c. 152) bij Cheddar kazen was geconstateerd.

Zooals in de „Inleiding” is gezegd, scheen het wenschelijk om, naast de verschillen in chemische rijping, bij de met uiteenlopende pH's bereide kazen ook de verschillen in de consistentie van het zuivel en de ontwikkeling van den smaak na te gaan. Hierbij zij opgemerkt, dat bij het hier besproken onderzoek het er niet om te doen is geweest, kazen van uitstekende kwaliteit te maken, maar dat het verkrijgen van een belangrijk pH-verskil bij de 2 groepen voorop moest staan.

Bij den aanvang van elk periodiek verricht chemisch onderzoek van 2 proefkazen eener parallelproef werden deze ook door een viertal personen op consistentie en smaak onderzocht. Zonder nu in te veel bijzonderheden te treden, kan als algemeen optredend verschijnsel vermeld worden, dat

wat de *consistentie* aangaat, het zuivel van alle kazen met hooger pH bereid, aanvankelijk zacht en veerkrachtig was; de boorsels waren echter min of meer taai („rubberachtig”), waardoor de uitsmeerbaarheid slecht was. Bij twee van deze minder zure kazen, AC en HK, was dit gebrek vrij spoedig, n.m. na 3 resp. 6 weken, praktisch geheel verdwenen, doch bij AB en AD duurde dit resp. $3\frac{1}{2}$ en 5 maanden. Bij AB was na $8\frac{1}{2}$ maand het boorsel wegens te groote hardheid opnieuw niet meer uitsmeerbaar geworden, zonder evenwel taai te zijn.

Wat de zuurdere, met lageren pH bereide kazen betreft, die reeds in de eerste weken der rijping vrij stevig waren, deze vertoonden geen van alle het gebrek „taai”. Wel bleek, dat de kazen WX en YZ der eerste 2 proeven, waarbij tijdens hun bereiding in het geheel geen wei door water was vervangen, reeds spoedig bros en kort werden. Bij de 2 andere kazen met lageren pH, WX' en K van de 3e en 4e proef, waar een weinig water was toegevoegd, was van brosheid niets te merken en bleek de uitsmeerbaarheid voortdurend goed te zijn.

Het belangrijkste feit, dat bij de beoordeeling van den *smaak* werd geconstateerd, was, dat bij alle kazen, met hooger pH bereid, de ontwikkeling van den typischen kaassmaak eenigszins later merkbaar werd dan bij de zuurdere kazen der zelfde parallelproef.

Verder kregen de minder zure kazen na eenigen tijd, variërend van 2 tot 5 maanden, een min of meer duidelijken bitteren bijmaak; bij de abnormaal snel rijpende AB-kazen der eerste proef werd deze smaak zelfs overheerschend, toen na $5\frac{1}{2}$ maand de pH tot ruim 6 was gestegen, welk verschijnsel zijn verklaring zou kunnen vinden in de werking der reeds hiervóór genoemde bacteriën.

De bij de zuurdere kazen eerder optredende rijpingssmaak bleef daarentegen maanden lang goed tot vrij goed, al werd de daarbij somtijds waargenomen pikante smaak niet door elk der beoordeelaars evenzeer op prijs gesteld en wel eens „te scherp” of „eenigszins bitter” genoemd.

Het snellere rijpen der zuurdere kazen, voor zoover het de smaakontwikkeling betreft, ging bij deze parallelproeven dus blijkbaar *niet* gepaard met een snellere eiwitafbraak, die zooals hiervóór is aangetoond, bij de zuurdere kazen juist minder intensief bleek te verlopen.

SAMENVATTING

Een onderzoek werd ingesteld naar den invloed van den pH op de in verschillende rijpingsstadia van Edammer 40+ kaas gevormde hoeveelheden eiwitsplitsingsproducten en op de consistentie der kaas en de smaakontwikkeling daarin.

Hieraan voorafgaand werden verschillende voor het chemisch onderzoek van kaasextracten gebruikelijke methoden op haar waarde en geschiktheid voor het hier beoogde doel nagegaan en, wanneer dit wenschelijk scheen, sommige werkwijzen gewijzigd.

Bij de bespreking van de bereiding der kaasextracten werd gewezen op het gebrek aan eenheid van werkwijze en de noodzakelijkheid om daarbij een voldoende schudduur en een niet te lage temperatuur in acht te nemen.

Voor de afzondering van de groep der eventueel in de kaasextracten nog aanwezige onveranderde wrongeleiwitten en der eiwitachtige eerste splitsingsproducten werd een methode uitgewerkt, waarbij de stikstof der bij verwarming met verschillende porties verdund zoutzuur in maximale hoeveelheid coaguleerbare extractbestanddeelen werd bepaald.

Een onderzoek over de bepaling der aminozuurstikstof volgens de phosphorwolframzuurmethode leerde, dat bijzondere maatregelen noodig zijn gebleken om de zekerheid te hebben, dat steeds de juiste hoeveelheid reagens wordt toegevoegd. De methode heeft verder het nadeel, dat bij deze behandeling, beoogende alle niet-aminozuurverbindingen uit het extract te verwijderen, tevens een zeker percentage der basische aminozuren (arginine, histidine en lysine) mee precipiteert. Bij het nagaan van hetgeen over de oplosbaarheid der phosphorwolframaten bekend is, bleek echter de waarschijnlijkheid groot, dat — althans onder de omstandigheden van het hier besproken onderzoek — het te kort aan totale aminozuurstikstof niet zeer belangrijk kan zijn.

Niettemin werd het wenschelijk geacht, naast deze werkwijze ook de titrimetrische aminozuurstikstofbepaling volgens SÖRENSEN geregeld toe te passen, waarbij enkele kleine wijzigingen werden aangebracht.

Voor de bepaling der ammoniumstikstof werd de destillatiemethode bij verminderden druk met MgO gekozen.

De wijze van uitvoering van al deze methoden werd in Hoofdstuk I in bijzonderheden meegedeeld.

De bereiding van een dubbele reeks proefkazen geschiedde vier maal en in verschillende tijden van het jaar. Telkens werden uit eenzelfde melk 2 bakken kaas gemaakt met een aanmerkelijk verschil in pH, waarbij, als eenig onderscheid in werkwijze, in een der twee bakken een vrij groote hoeveelheid wei door water werd vervangen, terwijl dit in den anderen bak niet, of slechts in zeer beperkte mate, geschiedde.

Het hierdoor bereikte pH-verskil bedroeg na één week ± 0.3 en veranderde verder slechts weinig.

Ten einde de bereiding van de extracten der kazen met verschillende pH's onder geheel gelijke omstandigheden te doen geschieden, werd er voor gezorgd dat de pH's gedurende de extractie zooveel mogelijk telkens in beide gevallen dezelfde waren.

Het chemisch onderzoek dezer extracten had tot voornaamste resultaat, dat bij de kazen van elk der 4 parallelproeven, behalve soms in de eerste weken der rijping, niet alleen de wateroplosbare N, doch na de verdere rijpingstijden ook de toenemende hoeveelheden der aminozuur N en der ammonium N, uitgedrukt in procenten der totale kaasstikstof, telkens grooter bleken te zijn voor de minder zure dan voor de zuurdere kazen. Dit wijst op een intensievere chemische rijping der eerste, vooral voor zoover het betreft een snellere vorming der producten eener gevorderde eiwitsplitsing.

Wat de belangrijke middengroep der albumosen en peptonen betreft, waarvan de hoeveelheden N bij benadering konden worden berekend: bij elk der eerste 2 parallelproeven was ook na alle rijpingstijden de gevormde hoeveelheid albumose- en pepton N duidelijk het grootst bij de minder zure kazen; bij de 2 laatste proeven, waar tijdens de bereiding der zuurdere kazen een kleine hoeveelheid water werd toegevoegd, was dit slechts na matig lange rijpingstijden het geval.

De bij de rijping der kazen afnemende hoeveelheden oplosbare eiwitten en eiwitachtige eerste splitsingsproducten daarentegen, vertegenwoordigd door de gevonden waarden der „maximaal coaguleerbare N", waren, afgezien van de eerste weken der rijping, doorgaans kleiner voor de minder zure kazen, hetgeen kan samenhangen met een hierin sterkere afbraak der genoemde producten, waardoor ook hier de neiging tot intensievere rijping der kazen met hooger pH tot uiting zou komen.

Behalve de rijping in chemisch opzicht, voor zoover dit de eiwitsplitsing betreft, werden ook de smaakontwikkeling in de kazen en de consistentie daarvan geregeld onderzocht. Hierbij is gebleken, dat bij alle parallelproeven de eigenaardige smaak van gerijpte kaas het eerst duidelijk merkbaar werd in de zuurdere kazen, waarvan verder het zuivel aanmerkelijk steviger was dan bij de kazen met hooger pH, terwijl bij deze laatste aanvankelijk een zekere rubberachtige taaiheid optrad, die echter na korteren of langeren tijd practisch geheel was verdwenen.

Als algemeen voor deze proeven met Edammer kaas geldend resultaat is dus gebleken, dat de bovenbedoelde snellere chemische rijping der kazen met hooger pH *niet* gepaard ging met een snellere rijping voor zoover het de ontwikkeling van den smaak betreft, daar dit laatste juist bij de zuurdere kazen het geval is gebleken.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Untersuchung wurde angestellt über den Einfluss des pH's auf die Menge der in verschiedenen Reifungsstadien von Edamer 40+ Käse entstandenen Eiweissabbauprodukten und auf die Konsistenz des Käses und die Entwicklung des Geschmacks darin.

Hieran vorübergehend wurden verschiedene, bei der chemischen Untersuchung von Käseextrakten übliche Verfahren geprüft auf ihren Wert und ihre Tauglichkeit für das hier beabsichtigte Ziel, und wenn erforderlich, abgeändert.

Es wurde hingewiesen auf die geringe Uniformität der Methoden, welche bei der Zubereitung der Extrakten in Anwendung werden gebracht und die Notwendigkeit wurde betont, um dabei die Mischung einem hinreichend langen fortwährenden Schütteldauer zu unterziehen bei einer nicht zu niedrigen Temperatur.

Zwecks Absonderung der in den Käseextrakten vorkommenden ursprünglichen Eiweisse des Bruches, zusammen mit den ersten eiweissartigen Spaltungsprodukten, wurde eine Methode ausgearbeitet, sich gründend auf die Stickstoffbestimmung der beim Erwärmen mit verschiedenen Portionen verdünnter Salzsäure in maximaler Menge coagulierbaren Extraktbestandteile.

Eine Untersuchung der Phosphorwolframsäuremethode zur Bestimmung des Aminosäurestickstoffs zeigte, dass besondere Vorkehrungen notwendig sind um gewiss zu sein, dass immer die richtige Menge des Reagenzes zugegeben wird. Das Verfahren hat weiter den Nachteil, dass hiermit ausser den Nicht-aminosäureverbindungen zugleich ein gewisser Teil der basischen Aminosäuren (Arginin, Histidin und Lysin) präzipitieren kann. Bei der Nachprüfung der betreffenden Angaben im Schrifttum ergab sich dennoch, dass die Löslichkeit der Phosphorwolframatene der basischen Aminosäuren wohl ausreicht dafür, dass bei den hier im Frage kommenden geringen Konzentrationen, der Fehlbetrag an totalem Aminosäurestickstoff im Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlags nicht sehr beträchtlich sein soll.

Jedoch liess es sich als wünschenswert erscheinen, neben den genannten Verfahren auch die titrimetrische Bestimmung des Aminostickstoffs nach SÖRENSEN in Anwendung zu bringen.

Zur Bestimmung des Ammoniumstickstoffs in den Käseextrakten wurde das Destillationsverfahren bei niedrigem Drucke mit MgO gewählt.

Besonderheiten in der Ausführung aller dieser Methoden wurden in Abschnitt I erörtert.

Die Herstellung einer doppelten Reihe von Probekäsen geschah viermal und in verschiedenen Jahreszeiten. Jedesmal wurden aus derselben Milch in zwei Wannen mehrere Käse hergestellt mit einem beträchtlichen Unterschied im pH, der dadurch bewirkt wurde, dass in einer der Wannen eine ziemlich grosse Menge der Molke durch Wasser ersetzt wurde. Die hierdurch erreichte pH-Differenz betrug nach einer Woche $\pm 0,3$, und änderte sich später nur sehr wenig. Damit die Zubereitung der Extrakten von jedesmal zwei Käsen verschiedenen Säuregrades sich unter ganz denselben

Umständen ereignen sollte, wurde dafür Sorge getragen, dass das pH während der Extraktion in beiden Fällen möglichst dasselbe war.

Das wichtigste Resultat der chemischen Untersuchung dieser Extrakten war, dass bei jedem der vier Parallelversuche und — ausgenommen eine kurze Vorperiode — nach jeder Reifungszeit, nicht nur die wasserlösliche N, sondern auch die zunehmenden Mengen von Aminosäure- und Ammonium N, grösser waren für die Käse mit anfänglich höherem pH als für diejenigen, welche mit niedrigerem pH dargestellt waren.

Dieses Verhalten deutet hin auf eine intensivere chemische Reifung der erstgenannten Käse, besonders insofern dieser Umstand zur Ausseerung kommt in einer schnelleren Bildung von Produkten der tiefergehenden Eiweisszersetzung.

Was die wichtige Mittelgruppe der Albumosen und Peptonen anbelangt, deren N-gehalt annähernd berechnet werden kann, auch für diese war bei jedem der ersten zwei Parallelversuche die gefundene Menge immer deutlich eine grössere für die weniger säuren Käse; dasselbe war bei den letzten zwei Versuchen, wo bei der Herstellung der säureren Käse ein wenig Wasser zugegeben war, nur nach mässig langen Reifungszeiten der Fall.

Die bei der Reifung abnehmende Menge der löslichen Eiweisse und ersten Spaltungsprodukte war dagegen durchgängig die geringere für die Käse mit höherem pH, was eine Folge sein kann von einer stärkeren Zersetzung dieser Produkte in diesen Käsen. Auch auf diese Weise könnte die Neigung zur intensiveren Reifung der Käse von niedrigerer Azidität zum Ausdruck kommen.

Neben dieser Reifung in chemischem Sinne wurde zugleich die Reifung, wie sie nach dem Geschmack beurteilt wird, regelmässig untersucht, während auch die Konsistenz der Käse geprüft wurde. Dabei ergab sich, dass immer der typische Geschmack von gereiftem Käse zuerst bei den mit niedrigerem pH bereiteten Käsen merkbar wurde, deren Teig ausserdem bedeutend fester war als derjenige der Käse mit höherem pH, indem bei diesen eine gewisse gummiartige Zähigkeit eintrat, welche dennoch nach kürzerer oder längerer Zeit praktisch ganz verschwunden war.

Als ein für diese Versuche allgemein gültiges Ergebnis hat sich also gezeigt, dass die schnellere Eiweisszersetzung in den Käsen mit höherem pH *nicht* verbunden war mit einer schnelleren Reifung nach dem Geschmack, weil die letzt genannte Eigenschaft sich eben zeigte bei den Käsen von höherer Azidität.

SUMMARY

A study was made concerning the influence of the pH on the protein-degradation in Edam 40+ cheese; at the same time the consistency and the development of the typical cheese taste were examined.

Preliminary to this investigation several methods, generally used at the analysis of cheese extracts, were tried with regard to their value and their applicability to the purpose in question, and if thought desirable, modified accordingly.

In discussing the preparation of the cheese extracts, the lack of uniformity in the methods used for it, was mentioned and the necessity of shaking the cheese-water mixture for a long time and at a sufficient high temperature was emphasized.

A method was elaborated for the separation of the unaltered part of curd proteins present in the extracts, together with such first degradation-products, as still show a protein character. For this purpose the N of the substances, that coagulate in a maximal quantity when different amounts of diluted HCl were added to the warmed extract, was determined.

A study on the estimation of the amino acid N with the phosphotungstic acid method proved the necessity of taking some precautions in order to be sure, that always, the exact quantity of reagent is added. An objection that may be made to this method is, that in using this reagent with a view to remove all non-amino acid compounds from the extract, a certain percentage of the basic amino acids (arginin, histidin and lysin), also may precipitate. Considering what is mentioned in the literature about the solubility of the phosphotungstates of the basic amino acids, it could be calculated however, that the deficit of the total amino acid N — at least under the circumstances of the studies described in this paper — cannot be very important. Nevertheless it was thought desirable to make use also of the titrimetric amino acid estimation according to SÖRENSEN, some slight modifications being applied to this procedure.

As for the estimation of the ammonium N, the distillation method at a reduced pressure with MgO was chosen.

The manner of execution of all these methods was detailed in Chapter I.

A double series of experimental cheeses was made four times in different seasons. Every time in each of two vats seven or eight cheeses were made from the same milk, but with a considerable pH-difference. For that purpose in one of the vats a rather large quantity of whey was substituted by an equal quantity of water, whilst in the other vat this was not done at all or only in a very limited measure. Thus the acquired difference in the pH of the young cheeses amounted to about 0,3 units.

In order to effectuate the preparation of the extracts from these cheeses at entirely the same conditions, it was provided for to bring the pH's of the extracting liquids on the same level as well as possible. The chemical investigation of these extracts resulted principally in the following facts, that hold for each of the four experiments, as far as not indicated otherwise.

Not only the amount of watersoluble N as a whole, but also the continually increasing quantities of amino acid- and ammonium N,

- (25) E. WINTERSTEIN en W. BISSEGER, Z. physiol. Ch. **47** (1906) 28.
- (26) O. HAMMERSTEN, l.c. (1914) 119.
- (27) P. KARRER, Lehrb. d. org. Chemie (1939) 304.
- (28) M. L. ANSON in: CARL. SCHMIDT, The chemistry of amino acids and proteins (1938) 407.
- (29) M. L. ANSON en A. E. MIRSKY, J. Gen. Physiol. **9** (1926) 169.
- (30) S. BONDZYNSKI, Landw. Jahrb. d. Schweiz **8** (1894) 181.
- (31) A. STUTZER, Z. anal. Chem. **35** (1896) 493.
- (32) L. DRECHSEL, Archiv f. Anat. u. Physiol. (1891) 254.
- (33) W. HAUSMANN, Z. physiol. Chem. **27** (1899) 95 en **29** (1900) 136.
- (34) F. KUTSCHER, Z. physiol. Chem. **31** (1900) 215.
- (35) H. H. MITCHELL en T. S. HAMILTON, The bioch. of the amino acids, New Y. (1929) 122.
- (36) H. CALVERY in: CARL. SCHMIDT, The Chemistry of amino acids and proteins (1938) 205.
- (37) W. GULEWITSCH, Z. physiol. Ch. **27** (1899) 178.
- (38) B. OSBORNE en I. F. HARRIS, J. Am. Chem. Soc. **25** (1903) 323.
- (39) J. C. DRUMMOND, Bioch. J. **12** (1918) 5.
- (40) D. D. VAN SLIJKE, J. Biol. Chem. **10** (1911—'12) 15.
- (41) H. B. VICKERY en CH. S. LEAVENWORTH, J. Biol. Chem. **76** (1928) 707.
- (42) W. L. DAVIES, Bioch. J. **21** (1927) 815.
- (43) H. H. MITCHELL en T. S. HAMILTON, l.c. 125.
- (44) K. V. THIMANN, Bioch. J. **20** (1926) 1190 en **24** (1930) 368.
- (45) L. A. ROGERS, (Associates of-) l.c. 50.
- (46) E. SUTERMEISTER, l.c. 20.
- (47) D. D. VAN SLIJKE, Abderhalden's Handb. d. biol. Arb. Meth. Abt. I, Teil 7 (1923) 53.
- (48) R. A. GORTNER en W. M. SANDSTROM, J. Am. Ch. Soc. **47** (1925) 1663.
- (49) M. T. HANKE en K. R. KOESSLER, J. Biol. Chem. **43** (1920) 533.
- (50) J. W. CAVET, J. Biol. Chem. **95** (1932) 335.
- (51) T. BRAILSFORD ROBERTSON, l.c. 71.

- (52) S. P. L. SÖRENSEN, *Bioch. Z.* **7** (1907) 45.
- (53) H. CALVERY, l.c. 193.
- (54) H. H. MITCHELL en T. S. HAMILTON, l.c. 130.
- (55) V. J. HARDING en R. M. MAC LEAN, *J. Biol. Chem.* (1916) 503.
- (56) E. ABDERHALDEN en FR. KRAMM, *Z. physiol. Chem.* **77** (1912) 428.
- (57) M. S. DUNN en A. LOSHAKOFF, *J. Biol. Chem.* **113** (1936) 359.
- (58) J. H. NORTHROP, *J. Gen. Physiol.* **9** (1926) 767.
- (59) V. HENRIQUES en S. P. L. SÖRENSEN, *Z. physiol. Chem.* **63** (1909) 27.
- (60) H. JESSEN—HANSEN, *Abderhalden's Handb. d. biol. Arb. Meth.* VI (1912) 262.
- (61) L. J. HARRIS, *Proc. Roy. Soc. London* **95** Ser. B (1924) 500.
- (62) H. H. MITCHELL en T. S. HAMILTON, l.c. 115.
- (63) N. SCHOORL, *Org. Analyse I* (1935) 114.
- (64) T. B. OSBORNE, C. S. LEAVENWORTH en C. A. BRAUTLECHT, *Am. J. Physiol.* **23** (1908) 180.
- (65) H. HOSTETTLER en E. ZOLLIKOFER, *Z. physiol. Chem.* **248** (1937) 183.
- (66) W. VAN DAM, *Bioch. Z.* **87** (1918) 107.
- (67) I. M. KOLTHOFF, *Tijdschr. v. verg. Geneesk.* XI (1925) 268.
- (68) D. BACH, *Bull. d. Sciences Pharmacol.* **34** (1932) 7, 425, 499.
- (69) L. A. ROGERS, (*Associates of*), l.c. 389, 390, 391.
- (70) W. VAN DAM, *Versl. v. landbk. Onderz.* **7** (1910) 56; *Centr. bl. f. Bakt. II*, **26** (1910) 189; *Opst. moderne Zuiv. chem.* 2e dr. (1922) 62 e. v.
- (71) L. L. VAN SLIJKE, H. A. HARDING en E. B. HART, *New Y. Exp. St. Geneva, Bull.* **233** (1903) 69.
- (72) S. ORLA JENSEN, *Dairy Bacteriology Sec. Ed.* (1931) 145.
- (73) CH. BARTHEL en E. SANDBERG, *Centr. bl. f. Bakt. II*, **44** (1915) 76 en **49** (1919) 392.
- (74) G. SCHWARZ, *Z. angew. Chem.* **51** (1938) 521.
- (75) K. VRONK, *Milchw. Zentr. bl.* **63** (1934) 20.
- (76) L. L. VAN SLIJKE en E. B. HART, *New Y. Exp. St. Geneva, Bull.* **236** (1903) 154.